農作物中のピペロニルブトキシサイドの分析について

(昭和 50 年 11 月 21 日受理)

一 色 賢 司^{1*} 渡 辺 忠 雄^{2*}

An Analytical Method of Piperonyl Butoxide in Agricultural Products

Kenji ISSHIKI^{*1} and Tadao WATANABE^{*2}

(*¹The Kitakyushu Municipal Institute of Environmental Health Sciences: 2-1, Shin'ike-1, Tobata-ku, Kitakyushu. *²Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University: Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka)

The clean-up methods and the gas-liquid chromatography for piperonyl butoxide (PB) were investigated to establish the analytical method of PB in agricultural products.

PB extracted with chloroform from sample was eluted from a Florisil column with a mixture of *n*-hexane, acetone and ethyl ether (3:1:1), and from a silica gel column with a mixture of benzene and chloroform (4:1), subsequently.

The detection and determination of PB were carried out with gas-liquid chromatograph equipped with a flameionization detector using silicone OV-1 or SE-30 column.

PB added to cereals and beans was recovered in the range from 80.5 to 101%.

(Received November 21, 1975)

食品添加物として指定されているピペロニルブトキシサイド (PB) は、ピレトリンなどの殺虫剤の共力剤であり¹⁾、穀類に 0.024 g/kg 以下の使用が認められている。また、PB は薬物代謝の阻害剤であり、生化学的な研究も行われている^{2)~4)}。

農作物中の PB の分析については、比色定量を行う AOAC 法⁵⁾および Secreast らの報告⁶⁾がある。しかし、これらの比色法では PB 以外の化合物も発色する可能性があり、操作が複雑である。また、農薬製剤中の PB の分析については、ガスクロマトグラフィーを用いた分析法が報告されているが^{7),8)}、農作物中には妨害物質が多く、PB の残留分析法として利用することは困難であった。

本実験において、農作物中の PB の残留量を知るために、クリーンアップおよびガスクロマトグラフィーの条件などについて検討を行い若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

北九州市内で販売されていた玄米、白米、ぬか、小

麦、大麦、そば、とうもろこし、大豆、小豆を購入して 5°に保存した。

2. 試薬

ピペロニルブトキシサイド：ガスクロ工業製残留農薬分析用標準品。

n-ヘキサン、クロロホルム、ベンゼン、アセトン：市販の一級品をガラス製蒸留装置で蒸留した。初留10%、後留20%をカットし、ガスクロマトグラム上に妨害ピークを与えないことを確認して用いた。

エチルエーテル：林純薬製残留農薬分析用。

酢酸エチル：和光純薬製特級品。

ピレン：東京化成製一級品。

リン酸：和光純薬製特級品。

酢酸：和光純薬製特級品。

タンニン酸：キンダ化学製。

フロリジル：Floridin Co. 製フロリジル (60~100メッシュ)。130°で15時間加熱活性化して用いた。

シリカゲル：和光純薬製ワコーゲル (100~200メッシュ)。130°で15時間加熱活性化して用いた。

無水硫酸ナトリウム：和光純薬製特級品を、600°で2時間加熱して用いた。

シリカゲル薄層板：ヤマト科学製 Replate-50 (50×200 mm)。

*¹ 北九州市環境衛生研究所：北九州市戸畑区新池 1-2-1

*² 九州大学農学部食糧化学工学科：福岡市東区箱崎

Table 1. Condition of Gas Chromatography

		2% OV-1	5% SE-30
Model		Shimadzu GC-3BF	
Column	Inner diameter (mm)	3	3
	Length (m)	2.1	1.2
Support	Mesh	Gas Chrom Q 60/80	Chromosorb 80/100
	Treatment	AW. DMCS.	AW. DMCS.
Carrier gas,	Flow rate (ml/min)	Nitrogen 60	
Detector		FID	
Temperature	Column (C)	250	
	Injection (C)	280

Fig. 1. Thin-layer chromatograms of standard PB and PB added samples

1: PB, 2: hulled rice, 3: unhulled rice, 4: corn, 5: wheat.

3. 装 置

ガスクロマトグラフ: 島津製 GC-3BF (検出器 FID)

粉碎機: 吉田製作所製ウィリー1029A型

振とう機: イワキ製 V-S 型

ロータリーエバポレーター: 柴田化学工業製, SPC 型

電気定温器: 池本理化学工業製1201型

4. 実験操作

4.1. 薄層クロマトグラフィー

薄層板としてシリカゲルの厚さ 0.2 mm の Replate-50 を用いた以外は, Olive の方法⁹⁾ に従って操作を行った。展開溶媒は, ベンゼン-酢酸エチル混液 (85:15, v/v) とし, 展開距離は 10 cm とした。発色剤は, 1 ml の 0.33% タニン酸を含む酢酸, 3 ml の 85% リン酸お

Fig. 2. Gas chromatograms of PB and pyrene as an internal standard

よび 26 ml のアセトンを使用直前に混合したものを用いた。展開後, 薄層板を乾燥させ, 発色剤を噴霧して電気定温器中で 90° に 15 分間保ち発色させた。

4.2. ガスクロマトグラフィー

定量は 2% シリコン OV-1 カラムと 5% シリコン SE-30 カラムを取り付けたガスクロマトグラフを用いて行い, その操作条件は Table 1 に示した。内部標準溶液として, ピレン 100 mg をアセトンに溶かして 1 L としたものを用いた。試験溶液に内部標準溶液 1 ml およびアセトンを加えて 5 ml とし, ガスクロマトグラフィーを行い, PB とピレンの面積比によって定量を行った。

4.3. フロリジルカラムクロマトグラフィー

内径 2 cm, 長さ 30 cm のクロマト管にまず無水硫酸ナトリウム 5 g, フロリジル 20 g, 無水硫酸ナトリウム 5 g の順に *n*-ヘキサンを用いた湿式法で充てんした。このカラムに試料を注入し, まず *n*-ヘキサン-エチルエー

Table 2. Recovery of PB by Florisil Column

Solvent system	Elution volume (ml)	Recovery (%)		
		Added PB (mg)		
		0.01	0.1	1
A	0~50	0	0	0
	50~100	0	0	0
B	100~150	99.0	98.5	98.0
	150~200	trace	0.8	1.6
	200~250	0	0	0

A, mixture of *n*-hexane and ethyl ether (1:1, v/v); B, mixture of *n*-hexane, acetone and ethyl ether (3:1:1, v/v)

Table 3. Recovery of PB by Silica Gel Column

Solvent system	Elution volume (ml)	Recovery (%)		
		Added PB (mg)		
		0.01	0.1	1
A	0~50	0	0	0
	50~100	0	0	0
B	100~150	trace	trace	tarce
	150~200	98.4	99.6	99.9
	200~250	0	0	0

A, benzene; B, mixture of benzene and chloroform (4:1, v/v)

テル混液 (1:1, v/v) 100 ml, ついで *n*-ヘキサン-アセトン-エチルエーテル混液 (3:1:1, v/v) 150 ml を用いて溶出した。溶出速度は 1 ml/min とした。溶出液はクデルナ・ダニッシュ (KD) 濃縮器で 5 ml 以下に濃縮した。

4.4. シリカゲルカラムクロマトグラフィー

内径 1 cm, 長さ 30 cm のクロマト管にまず無水硫酸ナトリウム 1 g, シリカゲル 3 g, 無水硫酸ナトリウム 1 g の順にベンゼンを用いた湿式法で充てんした。このカラムに、試料を注入し、まずベンゼン 100 ml, ついでベンゼン-クロロホルム混液 (4:1, v/v) 150 ml を用いて溶出した。溶出速度は 1 ml/min とした。溶出液は KD 濃縮器で濃縮した後、空気を吹き付けて残った溶媒を揮散させた。

4.5. 試験溶液の調製

粉碎機を用いて粉碎し均質化した試料 25 g に、0.01, 0.1 および 1 mg の PB を添加した後、300 ml の分液漏斗に入れ、クロロホルム 200 ml を加えて垂直型振とう機で 1 時間激しく振とう抽出した。抽出後、ガラス漏斗 G-3 または G-4 を用いて吸引ろ過し、残留物をクロロホルム 200 ml でよく洗浄した。ろ液を無水硫酸ナト

リウムで脱水した後、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。この濃縮液を、薄層クロマトグラフィー用検液とした。また、濃縮液をヘキサンで 5 ml とし、フロリジルカラムクロマトグラフィー、ついでシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ガスクロマトグラフィー用検液とした。

実験結果

1. 薄層クロマトグラフィー

PB は、 $R_f=0.82$ に青色のスポットとして検出され、最少検出量は 1 μg であった。Fig. 1, に、白米、玄米、とうもろこしおよび小麦に 40 ppm の PB を添加した時の結果を示した。

2. ガスクロマトグラフィー

Fig. 2 に PB の OV-1 および SE-30 カラムを用いたガスクロマトグラムを示した。内部標準物質のビレンに対する PB の相対保持時間は、OV-1 で 1.78, SE-30 では 2.06 であった。SE-30 では、ピークがややテーリングを示した。両カラムとも Table 1 に示す条件下で 0.005 μg の PB をフルスケールの 3% として検出が可能であった。

Table 4. Average Recovery of PB Added to Some Agricultural Products

Sample	No. of Samples	Recovery (%)		
		Added PB (mg/25 g sample)		
		0.01	0.1	1
Unhulled rice	4	93.2±4.3	86.3±1.8	100 ±3.7
Hulled rice	6	96.3±9.5	98.4±4.3	94.0±7.0
Rice bran	4	84.3±5.3	87.5±9.6	93.5±4.1
Wheat	3	97.8±4.1	101 ±9.3	95.5±7.9
Barley	3	98.4±6.6	94.0±5.7	85.4±5.5
Buck wheat	3	93.7±7.5	87.0±7.4	90.6±8.8
Corn	3	88.4±3.0	95.0±4.5	87.6±9.7
Soy bean	4	93.1±7.1	80.5±3.2	84.8±5.7
Red bean	3	87.0±7.9	90.4±7.1	88.7±2.5

Figures indicate average±S.D.

3. クリーンアップ

試料中の PB をクリーンアップするために、まずフロリジルカラムクロマトグラフィーの検討を行った。PB はフロリジルカラムにおいて、Table 2 のように *n*-ヘキサン-エチルエーテル混液 (1:1, v/v) 100 ml では溶出されず、*n*-ヘキサン-アセトン-エチルエーテル混液 (3:1:1, v/v/v) で溶出された。しかし、試料中の妨害物質は、フロリジルカラムによるクリーンアップだけでは除去することができなかった。溶出溶媒として、ベンゼンやクロロホルムを用いた場合は、PB のテーリングがあり、また妨害物質の除去もできなかった。そのため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを続けて検討した。PB はシリカゲルカラムにおいて、Table 3 のようにベンゼン 100 ml では溶出されず、ベンゼン-クロロホルム混液 (4:1, v/v) 150 ml で溶出された。

このフロリジルカラムとシリカゲルカラムを用いるクリーンアップによって試料中の妨害物質を除くことができた。なお、ぬかや大豆などの抽出物は、クリーンアップ後も PB 分画に着色がみられたが、ガスクロマトグラム上には妨害ピークとして現れなかった。

4. 添加回収実験

穀類および豆類に PB を添加して上述の実験操作に従いその回収率を求めると、Table 4 に示すように、80.5~101% の範囲内にあった。Table 4 は各試料につき 3 回ずつ添加回収実験を行った結果である。

考 察

農作物中に残留する PB の分析法について検討を行った結果、フロリジルカラムおよびシリカゲルカラムによるクリーンアップを行った後、ガスクロマトグラフィーによる定性および定量分析が可能になった。クリーンアップ操作として、活性炭カラムクロマトグラフィーおよびアセトニトリル-*n*-ヘキサン分配についても検討を行った。しかし、PB は活性炭カラムから *n*-ヘキサン-エ

チルエーテル混液 (3:1, v/v) で回収されたが、ガスクロマトグラム上に妨害物質が多く、さらにフロリジルカラムおよびシリカゲルカラムによるクリーンアップが必要であった。また、アセトニトリル-*n*-ヘキサン分配においても、PB はアセトニトリル層に移行していたが、活性炭カラムの場合と同様に、フロリジルカラムおよびシリカゲルカラムによるクリーンアップが必要であった。したがって、ここではフロリジルカラムとシリカゲルカラムによるクリーンアップを採用した。PB はフロリジルカラムやシリカゲルに対して吸着力が強いいため、まず極性の低い溶媒により妨害物質を除去し、ついで極性のより高い溶媒で収率よく回収することができた。しかし、極性の高い試料に共存している色素などが PB 分画に溶出する場合があった。特にぬかや大豆では、PB 分画に着色がみられたが、ガスクロマトグラム上では内部標準物質および PB のピークと重ならず、定性または定量に影響を及ぼさなかった。

AQAC 法⁹⁾および Secreast らの方法⁷⁾では、濃縮をすべて空気の吹き付けによって行っているが、本実験ではロータリーエバポレーターと KD 濃縮器を用いた。これらの濃縮器の使用による PB の回収率の低下は見られず、濃縮時間も短縮された。

PB のガスクロマトグラフィーによる分析においてこれまでに、3~5% SE-30⁷⁾、5% OV-1⁸⁾、5% OV-17¹⁰⁾、10% OV-225¹¹⁾ および 10% Apiezon L¹²⁾ などのカラムが報告されている。本実験に当たり、5% DC-11、1~5% OV-1、2% OV-11、1~5% OV-17、2~5% SE-30、4% SF-96 および 3% XE-60 などのカラムについて検討したところ、2% OV-1 が最も良好であった。このことについては、米国食品薬品局の Schepman によっても同様の結果が得られている*。また、5% SE-30 も使用したが、2% OV-1 とともに 0.005 µg までの PB

* Schepman, J.B.: 私信

が検出可能であった。食品衛生法で現在許可されている PB の使用量は、穀類 1 kg 当たり 0.024 g 以下であるので、今回報告した方法は十分に残留分析法として使用できると思われる。また、Olive の方法⁹⁾にしたがって行った薄層クロマトグラフィーは、1 μ g の PB を検出し得たので、ガスクロマトグラフを用いなくても PB の定性分析法として適用できると思われる。

我々は現在食品や環境中に残留していると思われる PB について検討中である。

要 約

農作物中の PB の分析法について検討し、次のような結果を得た。

1) PB はフロリジルおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより他の妨害物質からクリーンアップされた。

2) PB のガスクロマトグラフィーの諸条件について検討し、2% OV-1 および 5% SE-30 カラムにより定量が可能であった。

3) 数種の穀類および豆類について、PB の添加回収実験を行い、80.5~101%の回収率を得た。

終りに臨み、終始御助言御援助をいただいた北九州市環境衛生研究所長、秋山 高博士はじめ職員の皆様に深く感謝いたします。

文 献

1) Casida, J. E.: J. Agric. Food Chem., **18**, 753 (1970).

- 2) Friedman, M. A., Greene, E. J., Csillag, R., Epstein, S. S.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **21**, 419 (1972).
- 3) Philpot, R. M., Hodgson, E.: Mol. Pharmacol., **8**, 204 (1972).
- 4) Solomon, K. R., Bowlus, S. B., Metcalf, R. L., Katzenellenbogen, J. A.: Life Sci., **13**, 733 (1973).
- 5) The Association of Official Analytical Chemists: "Method of Assoc. Offic. Anal. Chem., 12th ed." p. 551 (1975).
- 6) Seereast, M. F., Cail, R. S.: J. Agric. Food Chem., **19**, 192 (1971).
- 7) Bevenue, A., Kawano, Y., DeLano, F.: J. Chromatog., **50**, 49 (1971).
- 8) Meinen, V. J.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., **58**, 854 (1975).
- 9) Olive, B. M.: *ibid.*, **56**, 915 (1973).
- 10) McLeod, H. A., Butterfield, A. G., Lewis, A., Phillips, W. E. J., Coffin, D. E.: Anal. Chem., **47**, 674 (1975).
- 11) Albro, P. W., Fishbein, L., Fawkes, J.: J. Chromatog., **65**, 521 (1972).
- 12) Miller, W. K., Twett, O.: J. Agric. Food Chem., **15**, 931 (1967).