

# 穀類及び果実中のピペロニルプトキシドの 分析について

阿部 敦子 佐藤 稔 大内 格之 菊地由生子

## 要 旨

ODS カラムと蛍光検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるピペロニルプトキシド (PB) の分析法を検討した。80%エタノールを移動相として用いたとき、保持時間は9.5分で、励起、蛍光の極大波長は、それぞれ290nm, 325nmであった。

PB を n-ヘキサンで抽出し、n-ヘキサンを用いて Sep-Pak Silica に負荷したあと、n-ヘキサン・ジエチルエーテル (7:3) 混液を用いて溶出した。

この方法の回収率は62%~98%で、従来行われていたフロリジルカラムクロマトグラフィーとほぼ同様のクリーンアップ効果があった。

## 1. 緒 言

ピペロニルプトキシドは、食品衛生法で防虫剤として穀類に使用できる食品添加物で、その使用基準は、0.024g/kg である。また、ピレトリンなどの殺虫剤の共力剤として使用されるほか、アメリカ連邦規制 (CFR) では、穀類や、サクランボ、ブドウ、オレンジ、パイナップルなどの果実に対するポストハーベストとしての使用基準が設定されている<sup>1)</sup>。

試験法としては、フロリジルカラムクロマトグラフィーを行った後、FID 付きガスクロマトグラフィー (GC) で定量する方法<sup>2)</sup> (「食品衛生検査指針」<sup>3)</sup> ではこの方法を採用している。)、およびヘキサナーアセトニトリル分配と活性炭カラムクロマトグラフィーを行った後、蛍光-HPLC により定量する方法<sup>4)</sup> (「Draft」<sup>5)</sup> ではこの方法を採用している。) が報告されている。

これらの方法を比較検討したところ、GC 法は、HPLC 法に比べて十分な感度が得られず、また、活性炭カラムクロマトグラフィーは、活性炭の活性度がロットによって異なることがあり再現性が悪かった。

また、従来使われていた Hitachi-Gel#3010 などのポラスポリマーの充填剤は、移動相の水分含量に制限があり、移動相を変えることによる保持時間の調整がむずかしかった。

そこでわれわれは、移動相の制限が少なく、耐圧性にもすぐれた ODS カラムを用いた HPLC 条件を検討した。

また、フロリジルカラムクロマトグラフィーに代わ

るものとして、Sep-Pak Silica を用いたクリーンアップの方法を検討したところほぼ満足できる結果が得られたので、報告する。

## 2. 方 法

### 2-1 装 置

高速液体クロマトグラフ  
ポンプ：日立 L-6000  
蛍光検出器：日立 F-1150  
データ処理装置：島津 C-R5A  
蛍光分光光度計：日立 F-4000  
ホモジナイザー：Polytron  
遠心分離器：クボタ KR/600 P

### 2-2 試 薬 等

標準品

東京化成特級 ピペロニルプトキシド (純度約96%)

1,000ppm エタノール溶液を原液とし、適宜エタノールで希釈して0.1~10ppmとした。

フロリジルカラム

130℃, 16時間活性化したフロリジル (60-100 mesh) 20g 内径20mm長さ30cmクロマトグラフィー用ガラスカラムにn-ヘキサンで湿式充填し、さらに無水硫酸ナトリウム5g重層した。

n-ヘキサンは残留農薬試験用、エタノール及びメタノールは HPLC 用、その他はすべて特級品を用いた。Sep-Pak Silica

Waters製 使用前にn-ヘキサン10mlで洗浄した。

メンブランフィルター

アドバンテック東洋 DISMIC-13JP (PTFE)

### 2-3 試料の調整方法

#### 2-3-1 抽出

試料10gを350mlの遠沈管にとり、水20ml, n-ヘキサン50mlを加えて約1分間ホモジナイズし、ホモジナイザーの刃は、n-ヘキサンを用いて十分に洗った。

3,000rpm, 5℃で10分間遠心分離した後n-ヘキサン層を無水硫酸ナトリウム入りのフラスコに採取した。

さらに2回抽出操作を繰り返し、全抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後ろ過し、ロータリーエバポレーターで約2mlまで濃縮した。

#### 2-3-2 フロリジルカラムクロマトグラフィー

上記抽出液をn-ヘキサン10mlでフロリジルカラムに負荷した。

n-ヘキサン:ジエチルエーテル(1:1)100mlで洗浄後、n-ヘキサン:アセトン:ジエチルエーテル(3:3:1)150mlで溶出した。

#### 2-3-3 HPLC用試料の調製

溶出液を濃縮した後、窒素気流中で乾固させ、エタノール1mlに溶かした後、孔径0.2μmのメンブランフィルターでろ過してHPLC用試料とした。

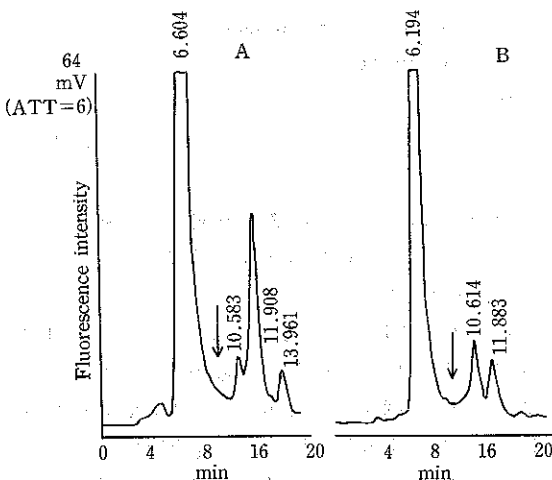


Fig. 1 Liquid Chromatogram of Rice Bran  
(A) purified by Florisil column chromatography  
(B) purified using Sep-Pak Silica

## 3. 結果及び考察

### 3-1 HPLC条件の検討

移動相は、エタノール:水(8:2)の時、保持時間が約9.5分で、妨害ピークと十分に分離できた。米ぬかのクロマトグラムはFig. 1の通りである。さらに、移動相の水の比率を増すことによって、保持時間を長くすることができる。

標準品の移動相溶液中の励起、蛍光スペクトルをFig. 2に示した。エタノール溶液中の極大蛍光波長は340nmであるが、この移動相中では325nm付近に極大があった。

HPLC条件をTable 1に示した。

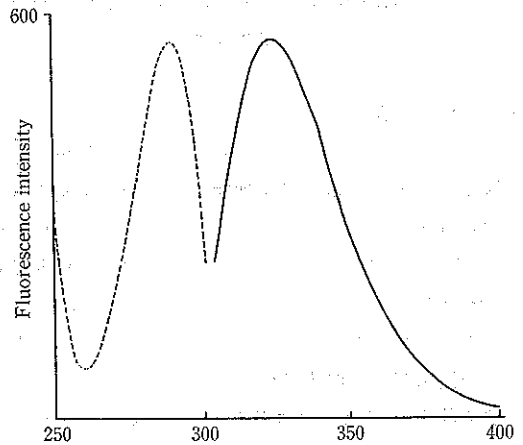


Fig. 2 Excitation and Emission Spectrum of PB  
excitation ----- emission  
concentration of PB, 10μg/ml in 80% ethanol  
condition of fluorophotometer;  
excitation bandpass : 5nm  
emission bandpass : 5nm  
response : 2sec  
scan speed : 60nm/min

Table.1 HPLC Condition

Column	: TSK-Gel ODS 80T <sub>M</sub> (4.0mm i.d.×25cm)
Mobile phase	: Water : Ethanol = 2 : 8
Column temperature	: Ambient
Flow rate	: 0.6ml/min
Wavelength	: Excitation 290nm Emission 325nm
Time constant	: 1
Sensitivity	: 1
Injection volume	: 10μl

### 3-2 Sep-Pak Silica からの溶出条件の検討

1  $\mu\text{g}$  のピペロニルブトキシド標準液を n-ヘキサン溶液とし, Sep-Pak Silica 負荷した後, n-ヘキサンとジエチルエーテルの各種混液で溶出した時の溶出曲線を Fig. 3 に示した。

ピペロニルブトキシドを完全に溶出するには, n-ヘキサン:ジエチルエーテル(9:1)では 25ml, n-ヘキサン:ジエチルエーテル(7:3)では 6ml, n-ヘキサン:ジエチルエーテル(5:5)では 4ml が必要で, n-ヘキサンのみでは全く溶出されなかった。

そこで, n-ヘキサンで負荷した後, n-ヘキサン 20ml で洗浄し, n-ヘキサン:ジエチルエーテル(7:3) 10ml で溶出することとした。

米ぬかについて, フロリジルカラムクロマトグラフィーと Sep-Pak Silica でクリーンアップした時のクロマトグラムを比較すると (Fig. 1), ほぼ同様の効果があることがわかる。

### 3-3 検量線と定量限界

検量線は Fig. 4 の通り, 0.1ppm から 10ppm まで良好な直線性を示した。

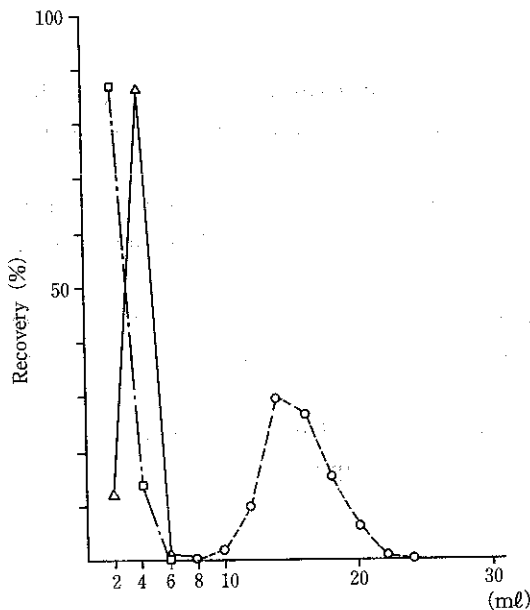


Fig. 3 Elution patterns from Sep-Pak Silica

- n-hexane: diethyl ether(9:1)
- △—△ n-hexane: diethyl ether(7:3)
- n-hexane: diethyl ether(5:5)

定量下限値は, 食品衛生法の穀類における使用基準が 24  $\mu\text{g}/\text{g}$ , CFR の果実における基準が 8  $\mu\text{g}/\text{g}$  であることを考慮して, 0.1  $\mu\text{g}/\text{g}$  とした。

### 3-4 添加回収の結果

PB を含まない試料 10g に標準品を 0.5~10  $\mu\text{g}$  添加し, (A) フロリジルカラムクロマトグラフィーまたは, (B) Sep-Pak Silica を用いたクリーンアップによる添加回収実験を行なった。回収率は(A)では 50%~96%, (B)では 62%~98% であった。(Table 2)

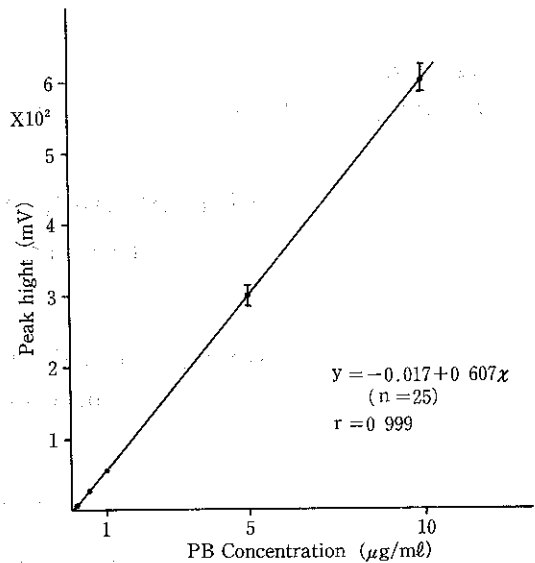


Fig. 4 Calibration Curve of PB

Table 2 Recovery of PB added to some samples

Sample	PB added ( $\mu\text{g}$ )	Recovery (%)
(A)		
Medium flour	1.0	50.4
Soft flour	10.0	96.2
American cherry	1.0	82.0
Orange (fruit with membranes)	1.0	82.0
(B)		
Hard flour	1.0	62.3
Pineapple	1.0	94.3
Orange (peel)	1.0	98.5
Rice bran	5.0	62.7
	0.5	76.5

Clean up method :

- (A) Florisil column chromatography
- (B) Sep-Pak Silica

小麦粉では、抽出操作の際、n-ヘキサン層で膨潤する固体があり、ヘキサン層を十分に採取することができなかったため、抽出時の回収率が悪かったのではないかと思われる。

また、Sep-Pakによるクリーンアップは、操作が簡単である反面、溶出液の流出速度の制御がむずかしいため、再現性の検討を繰り返し行なう必要があるように思われた。さらに、高濃度の試料で、回収率が悪かったことから、一度に負荷できる量について検討する必要があると思われる。

## 5. 結 語

蛍光-HPLCにより、PBは、より高感度で迅速に定

量できたが、Sep-Pak Silicaによるクリーンアップについては、今後、多種多様な検体について添加回収実験を行い、より回収率の高い方法を確立したい。

## 6. 文 献

- 1) Code of Federal Regulations 40, 1989.
- 2) 一色賢司, 渡辺忠雄: 食衛誌, 17, 231-235, 1976.
- 3) 厚生省生活衛生局監修「食品衛生検査指針食品中の食品添加物分析法」, 334-336, 1989.
- 4) 一色賢司, 津村周作, 渡辺忠雄: 食衛誌, 18, 159-163, 1977.
- 5) 厚生省生活衛生局食品化学課編「残留農薬分析法 Draft」, 168-172, 1985.

# Analytical Method of Piperonyl Butoxide in Cereals and Fruits

Atsuko Abe, Minoru Sato, Kakuyuki Ouchi  
and Yoko Kikuchi

## ABSTRACT

The analytical method of piperonyl butoxide (PB) was examined by using a high performance liquid chromatograph equipped with an ODS column and a fluorescence detector

The retention time of PB was 9.5 minutes when 80% ethanol was used as a mobile phase. and in this solvent, maximum wavelength of excitation and emission were 290nm, and 325nm respectively.

PB was extracted from the sample with n-hexane. The concentrated extract was added to Sep-Pak Silica to adsorb PB. After washing with n-hexane, the PB was eluted with a mixture of n-hexane: diethyl ether (7 : 3).

Recovery in this method was 62%-98%, and the clean-up effect was about the same as in the previous procedure of florisil column chromatography.