

ハーブ及び穀類・豆類加工品中のピペロニルブトキシド分析法

立石 恭也*, 高野 伊知郎*, 小林 麻紀*, 田村 康宏*,
富澤 早苗*, 酒井 奈穂子*, 上條 恭子*, 井部 明広*

Analysis of Piperonyl Butoxide in Herbs and Processed Foods of Cereals or Beans

Yukinari TATEISHI*, Ichiro TAKANO*, Maki KOBAYASHI*, Yasuhiro TAMURA*,
Sanae TOMIZAWA*, Naoko SAKAI*, Kyoko KAMIJO* and Akihiro IBE*

An analytical method for the determination of piperonyl butoxide in herbs and processed foods of cereals or beans was developed using HPLC equipped with a fluorescence detector. Piperonyl butoxide was extracted with acetonitrile. The crude extract was washed with saturated NaCl solution. After concentration, the extract was partitioned between saturated NaCl and *n*-hexane. The *n*-hexane layer was concentrated and put on an ENVI-CarbTM mini-column for cleanup, and was eluted with ethyl acetate-acetonitrile (3:7). Piperonyl butoxide was detected without interference on a chromatogram. The recoveries of piperonyl butoxide from samples were 75.6-94.4%, and the quantitation limit was 0.01 µg/g.

Keywords : ピペロニルブトキシド piperonyl butoxide, 高速液体クロマトグラフィー HPLC, ハーブ類 herbs, 穀類加工品 processed foods of cereal, 豆類加工品 processed foods of beans, 固相抽出 solid phase extraction

はじめに

ピペロニルブトキシド (PBO) は日本で開発された植物成長調整剤であり, 国内では「たばこ」に使用されていた。農薬としての登録は, 2004年7月1日付けで失効したが, 食品添加物の防虫剤として現在も穀類に使用されている。また, 諸外国においてはピレスロイド系殺虫剤の共力剤として多くの農作物に基準値が設けられていることから, 2006年5月より導入されるポジティブリスト制に対応して検査する必要があるもののひとつである。

筆者らは, 以前から蛍光検出器付 HPLC を用いて, 一般的な農薬の抽出法により各種農産物及びその加工品について PBO の残留実態を調査してきた。その中でほとんどの試料では抽出溶液を精製せずに直接 HPLC での分析が可能であったが, ハーブ及び穀類・豆類加工品の一部では食品由来の妨害ピークが多く, 測定に困難を生じた。そこで今回, これらの試料を対象として, 抽出法及び精製法について検討したので報告する。

実験方法

1. 試料

あらかじめ PBO が残留していないことを確認した市販のハーブ及び穀類・豆類加工品を用いた。

2. 試薬および標準品

1) PBO : 関東化学 (株) 製の残留農薬試験用標準品を用い, その標準品 10 mg をメタノールに溶解し全量を 50 mL として標準原液とした。また必要に応じてメタノールで希釈し, 農薬標準溶液として用いた。

2) 固相抽出カートリッジ : SupelcleanTM EnviTM-Carb (0.5 g/6 mL, SUPELCO 社製)

3) アセトニトリルおよびメタノールは高速液体クロマトグラフィー用, その他の試薬は残留農薬分析用を用いた。

3. 装置

HPLC : 島津製作所 (株) 製 LC-10AT, 蛍光検出器 : 日本分光 (株) 製 FP-930S, 恒温槽 : 日本分光 (株) 製 CTO-10AS, データ処理装置 : 島津製作所 (株) 製 C-R7A plus

4. 測定条件

カラム : CAPCELL PAK C18 UG80 (5 µm, 4.6 mm i.d × 150 mm, 資生堂 (株) 製), 移動相 : アセトニトリル-水 (6 : 4) 混液, カラム温度 : 50°C, 流速 : 1.2 mL/min, 蛍光検出器 (励起波長 : 290 nm, 蛍光波長 : 340 nm), 注入量 : 10 µL

* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

5. 抽出溶液の調製

試料 10 g をはかり採り、乾燥物の場合には試料を水で 1 時間から 2 時間浸漬した後、アセトニトリル 50 mL を加え、5 分間ホモジナイズ後吸引ろ過を行った。ろ液に飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて 5 分間振とうし、アセトニトリル層を分取した後、エバポレーターで減圧濃縮した。その残留物にヘキサン 100 mL 及び飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL を加えて 5 分間振とうし、ヘキサン層を分取した。ヘキサン層を無水硫酸ナトリウムで脱水、ろ過後、減圧濃縮し、残留物に 2 mL のメタノールを加え抽出溶液とした。

6. 固相抽出ミニカラムによる精製

ENVI™-Carb ミニカラム (0.5 g, 6 mL) を酢酸エチル 10 mL、アセトニトリル 10 mL 及びメタノール 20 mL でコンディショニングした。抽出溶液 0.5 mL を負荷し、メタノール 5 mL で洗浄した後、酢酸エチル-アセトニトリル (30 : 70) 混液 15 mL で溶出した。その混液を減圧濃縮後、残留物にメタノール 0.5 mL を加えて HPLC 用試験溶液とした。

結果及び考察

1. 抽出法の検討

3 種類の抽出法について検討した (Fig. 1)。一般的に PBO の分析法^{1, 2)} に用いられているヘキサンを抽出に用いた場合、ほとんどの試料で HPLC 上夾雑物による妨害は見られなかった。しかし、脂質の多い穀類・豆類加工品では、さらにアセトニトリル分配による脱脂操作が必要なのか、PBO の回収率が低下した。

また、一般的な農薬の抽出に用いられるアセトン-ヘキサン (2 : 3) 混液による抽出では、妨害となる夾雑物が多く、穀類加工品では脂質を多く含むため、脱脂操作が必

要であった。

厚生労働省から出された一斉分析法に用いられているアセトニトリル抽出³⁾ では、夾雑物が多いものの、抽出時に穀類加工品での脱脂操作が不要であった。

そこで今回、回収率が良く、夾雑物による妨害が少なく、しかも脱脂操作の不要な方法として、始めにアセトニトリルで抽出し、次にヘキサンで再抽出することとした。その結果、ほとんどの検体が直接 HPLC で分析できるようになった (Fig. 2)。しかし、レモンバームやチョコレートウエハースの場合には、妨害成分と PBO のピークが重なることもあったことから、さらにミニカラムによる精製法について検討した。

2. 固相抽出ミニカラムの検討

固相抽出ミニカラムは、Sep-Pak® Plus Florisil®, Sep-Pak® Plus Silica, Sep-pak® Vac Diol, Supelclean™ ENVI™-Carb, BOND ELUT-SCX, BOND ELUT-SAX, Sep-Pak® Plus NH2, Sep-Pak® Plus C18 及び Sep-Pak® Plus Waters Accell™ Plus QMA と分離モードの異なる 9 種類について検討した。

PBO は、Florisil® に対する吸着力が比較的強く、極性の低い溶媒では溶出しにくいとされていることより²⁾、一般的には Florisil® ミニカラムを用い、溶出にアセトン-ヘキサン混液を用いて精製が行われている¹⁾。そこで、まずアセトン及びヘキサンによる精製について検討した。各カラムに標準品のヘキサン溶液及び標準品を添加したハーブ抽出液をそれぞれ 1 µg/g を 0.5 mL 負荷し、溶出溶媒としてヘキサンを始めにアセトン-ヘキサン混液を順次濃度を変えて最終的にアセトンまで各 10 mL を流下した。しかし、全てのカラムにおいてヘキサンを流下した時点でほとんど PBO 及び夾雑物が溶出され精製が十分に

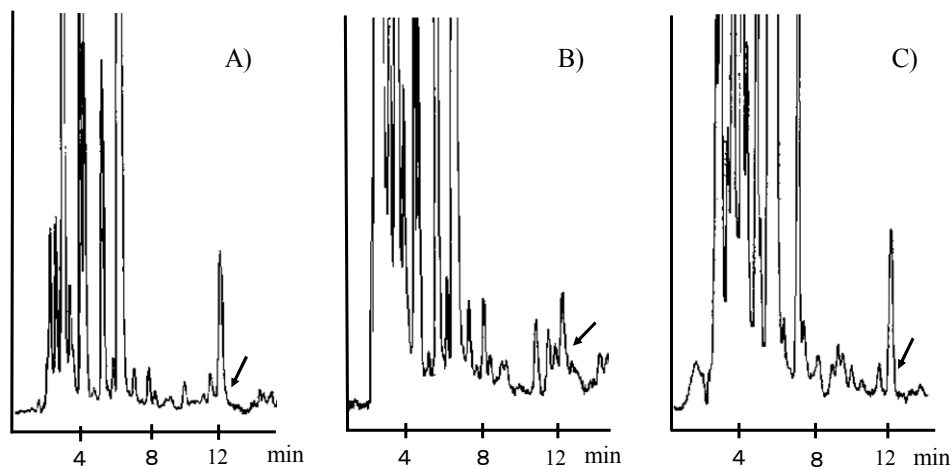


Fig. 1. HPLC Chromatograms of Lemon Balm Extracted Material in Each Organic Solvent

A) *n*-Hexane B) Acetone : *n*-Hexane (2 : 3) C) Acetonitrile

* The arrow point is the position where PBO would be detected

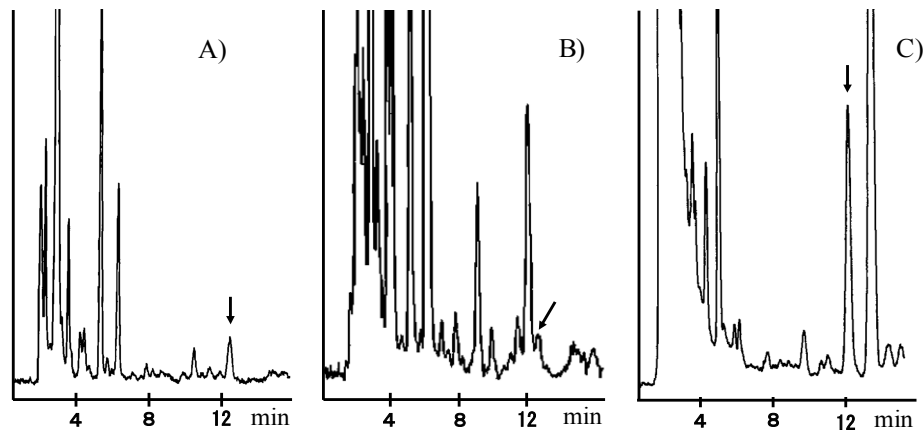


Fig. 2. HPLC Chromatograms of Sample Extraction Solutions Spiked with PBO

A) Coffee bean B) Lemon balm C) Chocolate wafer

*The arrow is a position of PBO

なされなかった。Florisol®に保持されなかった原因は、今回用いた Florisol®の活性度が低かった、あるいは保持容量が不足したためと考えられた。以上のことからミニカラムを用いたヘキサン等の有機溶媒での精製は難しいと思われた。

次にメタノール-水による精製について検討した。各カラムに標準品のメタノール溶液 1 µg/g を 0.5 mL 負荷し、溶出液として水を始めにメタノール-水混液を順次濃度を変えて最終的にメタノールまで各 10 mL を流下したところ、C18 を除き他のカラムでは PBO が回収できなかった。C18 での回収率は 60%であったが、水を含む系での溶出は、その後の濃縮操作が困難であった。

そこでメタノールを中心とした精製について検討した。各カラムについてアセトニトリル、メタノール及びその混液を用いた時の回収率を Table 1 に示した。メタノールを流下した時点で ENVI™-Carb を除くすべてのカラムで 80%以上の PBO が溶出した。また、標準品を添加したハーブ抽出溶液を負荷し実験を行ったところ、

同様の結果が得られ、ENVI™-Carb では、PBO を保持できることが判った。しかし、アセトニトリル比を上げても ENVI™-Carb では PBO が保持されたままであり、アセトニトリル 100%で流下しても 9%程度しか回収できなかった。そこで、次に ENVI™-Carb からの PBO の溶出条件を検討したところ、酢酸エチルを加えることで良好な結果が得られた。すなわち標準品 1 µg/g を 0.5 mL 負荷し、アセトニトリル、酢酸エチル-アセトニトリル混液を酢酸エチルの濃度を順次変えたもの及び酢酸エチルを各 10 mL ずつ流下させ PBO の溶出率について検討をした。その結果、酢酸エチル-アセトニトリル (20 : 80) 混液を 10 mL 流下した時点で 90%以上が溶出された (Fig. 3)。このことより、溶出溶媒には酢酸エチル-アセトニトリル (30 : 70) 混液を用いることとし、PBO を 1 µg/g 添加したハーブ抽出液について検討した。この際、夾雑ピークをなるべく除くため、初めにメタノール 5 mL で洗浄を行い、続いて酢酸エチル-アセトニトリル (30 : 70) 混液 10 mL で溶出させることとした。

Table 1. Elution Patterns of PBO Using Various Kind of Cartridges

Cartridges	Recovery (%)						Total
	Acetonitrile - Methanol						
	0:100	10:90	20:80	50:50	80:20	100:0	
Florisol ®	102.4	0	0	0	0	0	102.4
Silica	93.2	0	0	0	0	0	93.2
Diol	87.5	0	0	0	0	0	87.5
ENVI-Carb™	0	0	0	0	0	9.1	9.1
SCX	100.4	0	0	0	0	0	100.4
SAX	98.6	0	0	0	0	0	98.6
NH2	97.8	0	0	0	0	0	97.8
C-18	91.0	0	0	0	0	0	91.0
QMA	83.4	0	0	0	0	0	83.4

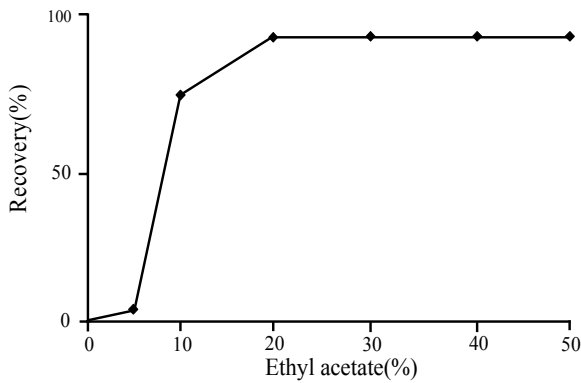


Fig. 3. Recovery from ENVI-carb™ with Ethyl Acetate and Acetonitrile

Table 2. Recovery of Spiked PBO from Samples (n=3)

	Added (μ g/g)	Recovery (%)	C.V. (%)
Herbs			
Lemon balm	0.05	90.7	4.9
Chamomile	0.05	84.9	5.2
Yarrow	0.05	84.7	7.2
Processed foods of Cereals			
Cornflakes	0.05	92.5	4.8
Chocolate wafer	0.05	90.1	5.6
Hardtack	0.05	75.6	5.6
Processed foods of Beans			
Coffee Bean	0.05	85.0	4.5
Chickpea (Garbanzo)	0.05	94.4	5.1

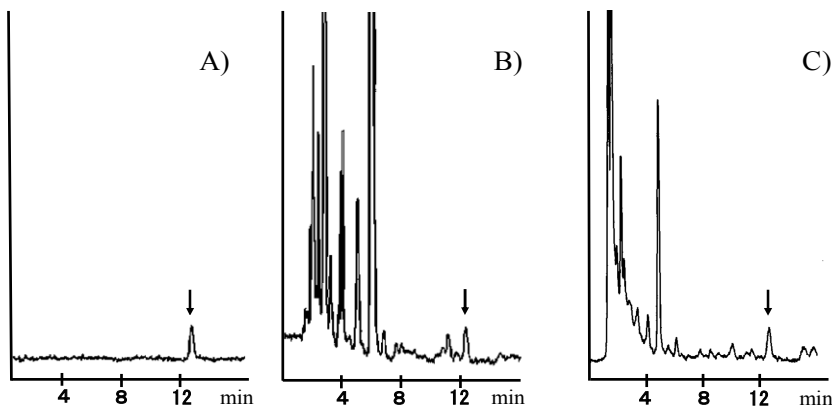


Fig. 4. HPLC Chromatograms of Cleanup Samples Spiked with PBO

A) Standard 0.25 μ g/g B) Lemon balm C) Chocolate wafer

* The arrows is a position of PBO

その結果、夾雑物が大幅に減少し、これまで困難であったレモンバーム等のハーブ類やチョコレートウエハース等の穀類加工品についても PBO の定性及び定量が可能となった(Fig. 4).

3. 添加回収実験

細切した試料に水を加えて 1 時間から 2 時間浸漬後、ピペロニルブトキシドが試料中で 0.05 μ g/g となるように添加、30 分放置後、回収試験を行った。その結果、回収率はレモンバーム、カモミール、セイヨウノコギリソウ等のハーブ類では 84.7%以上、コーンフレーク、チョコレートウエハース、乾パン等の穀類加工品で 75.6%以上、コーヒー豆、ヒヨコ豆等の豆類については 85.0%以上と残留農薬分析法としては、良好な結果と考えられた(Table 2)。なお、検量線は 0.05~1 μ g/g までで良好な直線性を示し、本法による PBO の定量限界は 0.01 μ g/g であった。

ま と め

HPLC 蛍光検出器によるハーブ及び穀類加工品等の PBO 分析法について検討した。

抽出にはアセトニトリル抽出及びヘキサン再抽出を組み合わせることで夾雑物を減少させることができた。

さらに Envi™-Carb を用いて精製を行ったところ、夾雑物が大幅に減少し、定性および定量が可能となった。

試料中で 0.05 μ g/g となるように PBO を添加し回収試験を行ったところ、75%以上と良好な回収率が得られ、日常の業務に十分適用できることが判明した。

(本研究の概要は日本食品衛生学会第 91 回学術講演会 2006 年 5 月で発表した。)

文 献

- 1) 農薬残留分析法研究班編：最新農薬の残留分析法，491-492，1995，中央法規出版，東京。
- 2) 厚生労働省監修：食品衛生検査指針，食品添加物編，366-371，2003，日本食品衛生協会，東京。
- 3) 厚生労働省医薬局保健部長通知：食安発第 0124001 号，平成 17 年 1 月 24 日。