

農作物中のピペロニルブトキシサイドの分析について (第3報)

ピペロニルブトキシサイド製品中に検出された不純物

(昭和 52 年 11 月 7 日受理)

一色 賢 司^{*1} 津 村 周 作^{*1} 渡 辺 忠 雄^{*2}

Analytical Method of Piperonyl Butoxide in Agricultural Products (III)

Impurities in Piperonyl Butoxide

Kenji ISSHIKI^{*1}, Shusaku TSUMURA^{*1} and Tadao WATANABE^{*2}

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

Impurities in piperonyl butoxide were analysed by gas chromatography. Each of the samples contained 80.5~98.6% pure piperonyl butoxide and another 5 kinds of foreign matters.

The sample was fractionated with a column and thin layer chromatography. Each of the cleaned up components showed a single peak by gas chromatography.

For the identification of each component, the elementary analysis and spectrometry (FD-Mass, EI-Mass, IR and NMR) were carried out. The following substances were identified as the impurities; 6-hydroxymethyl dihydrosafrole, 6-propylpiperonyl *n*-butylethyleneglycol ether, 6-propylpiperonyl *n*-butyldiethyleneglycol ether, 2-propyl-4, 5-dimethoxybenzyl *n*-butyldiethyleneglycol ether, bis(2-propyl-4, 5-methylenedioxypheyl) methane and di(2-propyl-4, 5-methylenedioxypheyl) ether.

(Received November 7, 1977)

ピペロニルブトキシサイド (PB) は食品添加物として穀類 1 kg 当たり 24 mg までの使用が認められている¹⁾。PB はサフロールを原料として 6-クロロメチルジヒドロサフロールとブチルカルビトールの縮合により合成され減圧下での分留により精製されている²⁾。

Albro ら³⁾は、米国産の technical grade の PB, 3 検体についてその成分の分析を行い、純度が 71.6, 80.6 および 90.1% で、さらに数種の不純物が含まれていたことを報告している。

著者ら^{4), 5)}は農作物中の PB の分析について検討を行っているが、その過程において残留 PB 分析用標準品にも不純物が検出され、食品添加物として使用されている PB の純度や不純物についても関心が持たれた。そこ

で、食品添加物 (I), 分析用標準品 (II), 試薬 (III) および農薬用共力剤 (IV) の各製品について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

- i) 食品添加物: 高砂香料 (株) 製
- ii) 分析用標準品: ガスクロ工業 (株) 製
- iii) 試薬: 東京化成工業 (株) 製
- iv) 農薬用共力剤: 三笠化学 (株) 製

2. 試薬

n-ヘキサン, シクロヘキサン, ベンゼン, アセトン: 市販の 1 級品をガラス製蒸留装置で蒸留して用いた。初留 10% 後留 20% を棄て、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。

アンスロン: 内部標準物質, キンダ化学 (株) 製特級品。

*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

無水硫酸ナトリウム：和光純薬(株)製特級品を600°で2時間加熱して用いた。

カラムクロマトグラフィー用シリカゲル：和光純薬(株)製ワコーゲル C-200 (74~149 μ m) を130°で15時間加熱活性化して用いた。

カラムクロマトグラフィー用フロリジル：Floridin社製フロリジル, Albro らの方法³⁾に従って調製した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) 用薄層板：シリカゲル薄層板は、和光純薬(株)製ワコーゲル B-5F (けい光指示薬入り) を常法により0.25および0.5 mmの厚さに調製し、105°で1時間活性化して使用した。キーゼルゲル薄層板は Merck 社製 PSC-Fertigplatten Kieselgel 60 F254 (厚さ 2 mm) をそのまま用いた。

3. 装置

ガスクロマトグラフ (GC)：島津製作所(株)製 GC-5A 型 (検出器 FID)

フラクションコレクター：東洋科学産業(株)製 SF-160K 型

TLC 用紫外線検出器：大沢紫外線工業(株)製スーパーライト LS-D1 型

質量分析計 (MS)：日本電子(株)製 JMS-OISG-2 型二重収束質量分析計

MS 用電子計算機：日本電子(株)製 JMS-98A 型

MS 用 GC：日本電子(株)製 20KP 型

MS 用イオン源：日本電子(株)製 JMS-OISG-2 型用 Electron Impact (EI) 型および Field Desorption (FD) 型

赤外分光光度計 (IR)：Beckman 社製 IR-20 型

核磁気共鳴分析計 (NMR)：日本電子(株)製 JNM-MH-100 型

融点測定装置：(株)柳本製作所製 MP-S2 型

4. 実験操作

4.1 ガスクロマトグラフィー

カラム充てん剤には、2% シリコン OV-1, 1 および 2% OV-17, 2% OV-225 を用いた。操作条件は Table 1 に示した。PB および不純物の定量は、カラムとして 1% OV-17 内部標準物質として アンスロンを用いて 3 回測定を行い平均値を求めた。

4.2 カラムクロマトグラフィー

内径 5 cm のクロマト管にまず無水硫酸ナトリウムを 2 cm の高さに、続いてシリカゲルを 50 cm の高さ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 10 g を注入し、ベンゼン：アセトン混液 (97 : 3, v/v) を用いて溶出させた。流速は 4 ml/min とし、溶出液はフラクションコレクターで 20 ml ずつ分画した。

4.3 薄層クロマトグラフィー

上記の各分画を薄層板にスポットし、次の展開溶媒を使用して展開した。

- i) ベンゼン：*n*-ヘキサン (2 : 1)
- ii) ベンゼン：シクロヘキサン (2 : 1)
- iii) ベンゼン：アセトン (97 : 3)
- iv) ベンゼン：アセトン (9 : 1)

展開距離は 15 cm とし、展開後紫外線検出器により検出された青色のスポットをアセトンを用いて溶出した。分離精製した各分画は GC 分析により、単一成分より成ることを確認して以下の実験を行った。

4.4 マススペクトル

EI-MS の測定は、各試料を3%シリコン OV-17 カラム (Chromsorb AW. DMCS. 60~80 mesh, 2 m×2 mm I.D.) を用いて MS に導入し、イオン化電圧 75 eV で行った。FD-MS の測定は、アセトンに溶かした各試料をエミッターに付着させエミッター電流 10 mA で行った。

4.5 赤外吸収スペクトル

各成分を NaCl のプレート上に薄膜としスペクトルを

Table 1. Condition of Gas Chromatography

		2% OV-1	1% OV-17	2% OV-17	2% OV-225
Model		Shimadzu GC-5A			
Column	Inner diameter (mm)	3	3	3	3
	Length (m)	2	1.5	2	2
Support	Mesh	Chromosorb 60/80			
	Treatment	AW. DMCS. Nitrogen			
Carrier gas	Flow rate (ml/min)	80	45	80	80
Detector Temperature		FID			
	Column (°C)	120~270			
	Programmed rate (°C/min)	5			
	Injection (°C)	200			

測定した。

4.6 核磁気共鳴スペクトル

1%テトラメチルシラン (0 ppm) を内部標準として、各成分のスペクトルを重クロロホルム中で測定した。

実験結果および考察

1. ガスクロマトグラフィー

試料 i)~iv) の GC クロマトグラムには Fig. 1, 2 のように、ピークの大きさには差が見られたが、同じ *Rt* 値を有する六つの主なピークが見られた。

2. カラムクロマトグラフィー

シリカゲルカラムから溶出された各分画をロータリーエバポレーターにより溶媒を除去し、各分画の重さを測定した。Fig. 3 は、試料 i) の分画の様子を示している。各分画について GC および TLC により分析を行ったところ、Fig. 1 および 2 の各ピークは、次の分画に検出された。

ピーク 1: 38~44分画。ピーク 2: 29~31分画。ピーク 3: 31~60分画。ピーク 4: 50~60分画。ピーク 5: 6~10分画、ピーク 6: 18~31分画。

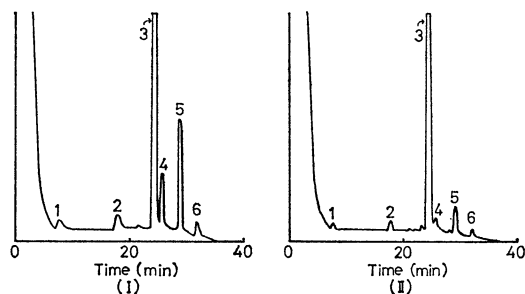


Fig. 1. Gas chromatograms of the samples (I), piperonyl butoxide as a food additive; (II), piperonyl butoxide as a standard for the residual analysis; column, 1% silicone OV-17 (1.5 m×3 mm I.D.); carrier gas, N₂ (45 ml/min); temp., 120~270°C (5°C/min); detector, FID

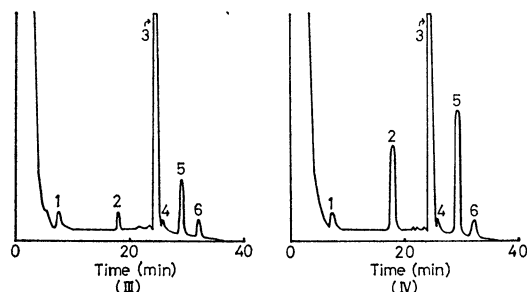


Fig. 2. Gas chromatograms of samples (III), piperonyl butoxide as a reagent; (IV), piperonyl butoxide as a pesticide synergist

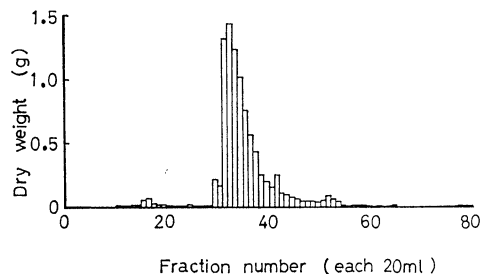


Fig. 3. Distribution of the eluted substances by column chromatography of piperonyl butoxide as a food additive. Column, silica gel (50 cm×5 cm I.D.); solvent, benzene:acetone (97:3)

なお、32~37の分画からは GC 分析において OV-1, OV-17, OV-225 の各カラムを用いても単一ピークを与える無色透明で粘性のある液体が回収され、後述の FD-マス、EI-マス、IR および NMR スペクトルの測定によって純粋な PB であることが認められた。Albro ら³⁾によって報告された純粋な PB の調製法では、カラム充填剤としての含水フロリジルの調製に1週間を要し、溶出溶媒もベンゼン-*n*-ヘキサン混液からベンゼン-エチルエーテル混液に切り替える必要があり、さらに再現性もあまり良くなかった。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる上記の方法では、シリカゲルの調製は1晩で十分であり、溶出溶媒も1種類で済み、再現性も良かった。しかし、32~37分画以外の分画は混合成分から成り、さらに精製を行う必要があった。

3. 薄層クロマトグラフィー

試料 i) を、キーゼルゲル薄層板に連続スポットしてベンゼン-アセトン混液 (97:3, v/v) で展開すると Fig. 4 のようなクロマトグラムが得られた。スポットの移動の様子はシリカゲル薄層板を用いた場合でもほぼ同様であった (Fig. 4)。また厚さ 2 mm のキーゼルゲル薄層板により 300 mg の試料を展開できるので、純粋な PB の調製には有効な手段であると思われたが、一度の展開だけでは PB の分画に他の不純物の混入が見られ、再度薄層クロマトグラフィーによって精製を行う必要があった。

上記のカラムクロマトグラフィーによる各分画を Table 2 の各展開溶媒を用いて分離精製し、GC 分析において単一ピークを与える精製物を得ることができた。ピーク1~4は常温で液体であったが、ピーク5および6は白色針状の結晶であり、融点はそれぞれ 63.0~64.5° および 91.5~92.0° であった。

4. 元素分析

TLC により精製した各成分について元素分析を行った。その結果を Table 3 に示した。実験式と分子式の各元素の含有率の差は 0.3% 以内であった。

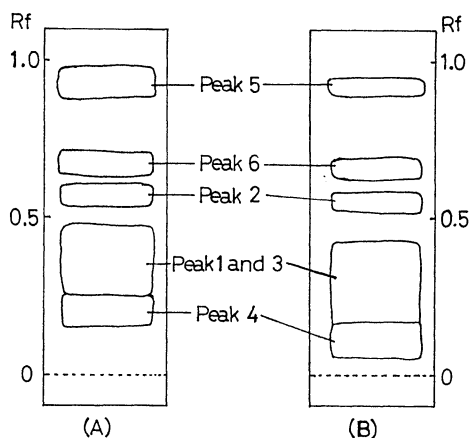


Fig. 4. Thin-layer chromatograms of piperonyl butoxide as a food additive
(A), kiesel gel plate (Merck 60 F254);
(B), silica gel plate (Wako B-5F); de-
veloping solvent, benzene:acetone=97:3

Table 2. Developing Solvent for the Purifica-
tion of Each Component

Peak	Developing solvent
1	Benzene:acetone 9:1
2	Benzene:acetone 97:3
3	Benzene:acetone 97:3
4	Benzene:acetone 9:1
5	Benzene:n-hexane 2:1
6	Benzene:cyclohexane 2:1

Table 3. Elementary Analysis

Peak	Empirical formula	Molecular formula
1	$C_{3.62}H_{4.65}O_{1.00}$	$C_{11}H_{14}O_3$
2	$C_{4.24}H_{6.44}O_{1.00}$	$C_{17}H_{26}O_4$
3	$C_{3.78}H_{5.99}O_{1.00}$	$C_{19}H_{30}O_5$
4	$C_{4.00}H_{6.83}O_{1.00}$	$C_{20}H_{34}O_5$
5	$C_{5.16}H_{5.96}O_{1.00}$	$C_{21}H_{24}O_4$
6	$C_{4.45}H_{5.26}O_{1.00}$	$C_{22}H_{28}O_5$

5. マススペクトル

FD-MS スペクトルを Fig. 5 に, EI-MS スペクトルを Fig. 6 に示した。FD-MS スペクトルの分子イオンピークは, 元素分析から得られた分子式の示す分子量と 6 成分共に一致した。EI-MS スペクトルにも各分子量に相当する分子イオンピークが見られた。メインピークは, ピーク 2, 3, 5 および 6 では m/e 176 であったが, ピーク 1 では 177, ピーク 4 では 107 であった。

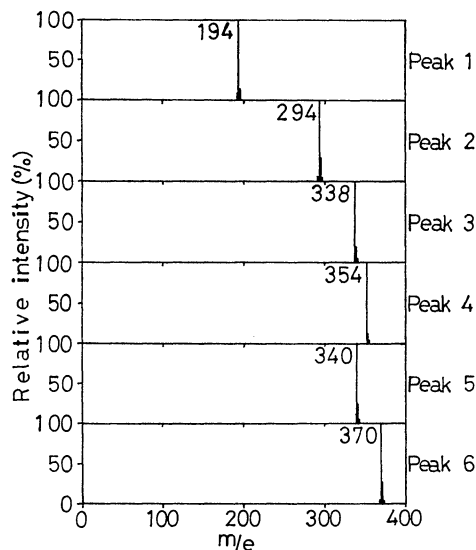


Fig. 5. Field-desorption mass spectra of the impurities in the samples

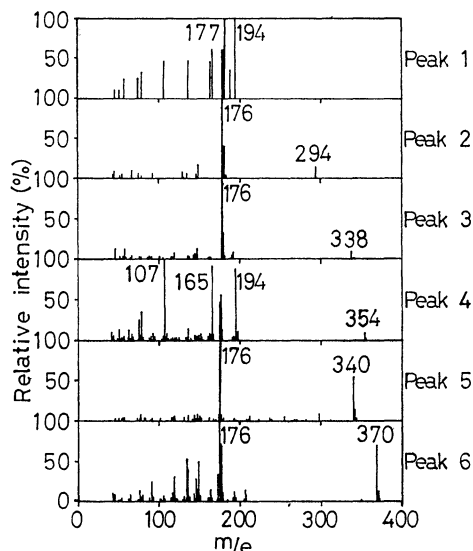


Fig. 6. Electron-impact mass spectra of the impurities in the samples

6. 赤外吸収スペクトル

ピーク 1~6 の IR スペクトルを Fig. 7 に示した。ピーク 1 のみが $-OH$ の吸収を 3300 cm^{-1} に示した。何れの化合物にも $1650\sim 1750\text{ cm}^{-1}$ の $C=O$ の吸収は見られなかった。ピーク 4 以外の化合物は, メチレンジオキシ環の吸収を 1255 cm^{-1} に示し, メチレンジオキシフェニル基の吸収を 1037 cm^{-1} に示した³⁾。ピーク 4 は, 芳香環に結合したメトキシ基の吸収を 1110 cm^{-1} に

Table 4. NMR Spectra of the Components in Samples

ppm	Type	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
0.9	Triplet	3	6	6	6	6	6
1.6	Multiplet	3	6	6	6	4	4
2.6	Triplet	2	2	2	2	4	4
3.5	Triplet	0	2	2	2	2	0
3.7	Triplet	0	4	8	8	0	0
3.85	Singlet	0	0	0	0	2	0
3.95	Singlet	0	0	0	6	0	0
4.6	Singlet	2	2	2	2	0	4
6.05	Singlet	2	2	2	0	4	4
6.85	Singlet	1	1	1	1	2	2
7.05	Singlet	1	1	1	1	2	2

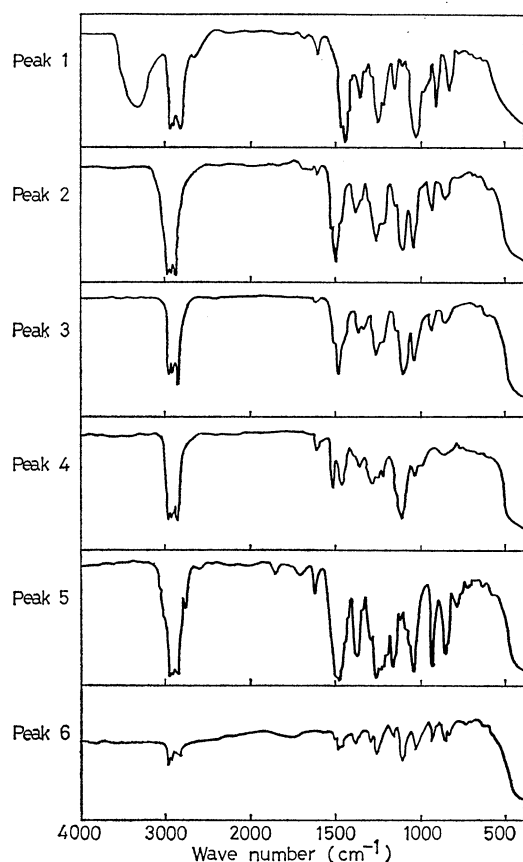


Fig. 7. Infrared spectra of the impurities in the samples

示した。ピーク2, 3および4にはブトキシエトキシ側鎖の脂肪族エーテルの吸収が 1100 cm^{-1} に、ピーク6にもエーテル結合による吸収が 1100 cm^{-1} に見られた。

Table 5. Assignment of NMR Peaks

ppm	Structure
0.9	C(Satd.)—CH ₃
1.6	C(Satd.)—CH ₂ —C(Satd.)
2.6	Ar—CH ₂ —CH ₂ —
3.5	C(Satd.)—CH ₂ —CH ₂ —
3.7	—O—CH ₂ —CH ₂ —O—
3.85	Ar—CH ₂ —Ar
3.95	Ar—O—CH ₃
4.6	Ar—CH ₂ —O—
6.05	—O—CH ₂ —O—
6.85	Ar—H
7.05	Ar—H

7. 核磁気共鳴スペクトル

NMR のスペクトルは Table 4 のように測定され、その各シグナルは、文献^{(3), (6), (7)}により Table 5 の化学構造によるものと推定された。測定された NMR のスペクトルにより、ピーク3は、PB の化学構造と一致していることが判明した。ピーク2は、PB の側鎖のエチレングリコールの繰り返しの一つ少ないものであり、ピーク1はエチレングリコールと *n*-ブチル側鎖のないものと推定された。ピーク4は、PB のジオキシメチレン環が開環し、二つのメトキシ基となっている化合物であると思われた。ピーク5および6は、ピーク1が二量体のようになった構造が推定され、ピーク5はメチレン基で、ピーク6はジメチルエーテル基で橋渡しをされている構造を考えた。

8. 各ピークの化学構造と各試料中の含有率

以上の各分析結果を総合すると Table 6 のようになり、各ピークの化学構造は次のように推定された。

ピーク1: 6-hydroxymethyl dihydrosafrole

ピーク2: 6-propyl piperonyl *n*-butylethyleneglycol

Table 6. Molecular Weight, Formula and Structure of Each Component in Samples

Peak	Molecular weight	Molecular formula	Structure
1	194	$C_{11}H_{14}O_3$	
2	294	$C_{17}H_{26}O_4$	
3	338	$C_{19}H_{30}O_5$	
4	354	$C_{20}H_{34}O_5$	
5	340	$C_{21}H_{24}O_4$	
6	370	$C_{22}H_{26}O_5$	

Table 7. Composition of Each Component in Samples

Compound	Peak	Weight %			
		(I)	(II)	(III)	(IV)
Piperonyl butoxide	3	84.9	98.6	95.7	80.5
Bis(2-propyl-4, 5-methylenedioxyphenyl)methane	5	4.55	0.73	1.98	5.22
2-Propyl-4, 5-dimethoxy <i>n</i> -butyldiethyleneglycol ether	4	2.00	0.05	0.11	0.26
Di(2-propyl-4, 5-methylenedioxybenzyl)ether	6	0.65	0.16	0.63	0.65
6-Propylpiperonyl <i>n</i> -butyl ethyleneglycol ether	2	0.48	0.22	0.60	3.65
6-Hydroxymethyl dihydrosafrole	1	0.22	0.03	0.60	0.65
Unaccounted for	—	7.20	0.21	0.38	9.07

(I). Piperonyl butoxide as a food additive; (II), Piperonyl butoxide as a standard for the residual analysis; (III), Piperonyl butoxide as a reagent; (IV), Piperonyl butoxide as a insecticide synergist.

ether

ピーク 3: 6-propyl piperonyl *n*-butyldiethyleneglycol ether (PB)

ピーク 4: 2-propyl-4, 5-dimethoxy *n*-butyldiethyleneglycol ether

ピーク 5: bis (2-propyl-4, 5-methylenedioxyphenyl)-

methane

ピーク 6: di (2-propyl-4, 5-methylenedioxybenzyl)-ether

また各試料中の各成分の含有率は Table 7 のようであった。

上記の化合物のうち、ピーク 4, 5 および 6 は Albro

らによって⁸⁾ technical grade の PB の不純物として報告されているものであったが、ピーク 1 および 2 については報告が見当らない。メチレンジオキシフェニル化合物については数多くの研究がなされ、約80種の化合物について、昆虫やほ乳類に対する影響を調べた報告^{8)~11)}があるが、その中には今回確認された PB の不純物はいずれも見いだされず、今後検討を加える必要があると思われる。

要 約

PB 製品中の不純物について検討を行い、次のような結果を得た。

(1) 4 種の PB 製品中の PB の含有率は80.5~98.6%であり、他に5種類の不純物が検出された。

(2) 不純物は、6-hydroxymethyl dihydrosafrole, 6-propylpiperonyl *n*-butylethyleneglycol ether, 2-propyl-4,5-dimethoxybenzyl *n*-butyldiethyleneglycol ether, bis(2-propyl-4,5-dimethoxyphenyl)methane, di(2-propyl-4,5-dimethoxybenzyl)ether であった。

終わりに臨み、NMR スペクトルの測定に御協力いただいた九州大学農薬化学教室桑野栄一博士と御助言御援助をいただいた北九州市環境衛生研究所所長秋山 高博士はじめ職員各位に深く感謝いたします。

文 献

1) 厚生省編：“第3版食品添加物公定書” p. 325

(1974).

- 2) 刈米達夫監修：“第3版食品添加物公定書解説書” p. 766 (1973) 広川書店。
- 3) Albro, P. W., Fishbein, L., Fawkes, J.: J. Chromatogr., **65**, 521 (1972).
- 4) 一色賢司, 渡辺忠雄: 食衛誌. **17**, 231 (1976).
- 5) 一色賢司, 津村周作, 渡辺忠雄: 食衛誌. **18**, 159 (1977).
- 6) Dyer, J.R. 著, 柿沢 寛訳：“有機化合物への吸収スペクトルの応用” p. 63, (1968) 東京化学同人。
- 7) 日本化学会編：“実験化学講座続 5” p. 538 (1965) 丸善。
- 8) Fujii, K., Jaffe, H., Bishop, Y., Arnold, E., MacKintosh, D., Epstein, S.: Toxicol. Appl. Pharmacol., **16**, 482 (1970).
- 9) Philleo, W. W., Schonbrod, R. D., Terriere, L.C.: J. Agric. Food Chem., **13**, 113 (1965).
- 10) Casida, J. E., Engel, J. L., Essac, E. G., Kamienski, F. X., Kuwatsuka, S.: Science, **153**, 1130 (1966).
- 11) Essac, E. G., Casida, J. E.: J. Agric. Food Chem., **17**, 539 (1969).
- 12) Casida, J. E.: *ibid.*, **18**, 753 (1970).