

## 生薬中のピレスロイド系農薬分析における 測定値のばらつき要因と残留実態

中嶋 順一<sup>\*</sup>, 浜野 朋子<sup>\*</sup>, 塩田 寛子<sup>\*</sup>,  
安田 一郎<sup>\*</sup>, 鎌倉 浩之<sup>\*\*</sup>, 合田 幸広<sup>\*\*</sup>

### The Factors of Deviation in Analyzing Pyrethroid Pesticides Residues and their Contents in Crude Drugs

Junichi NAKAJIMA<sup>\*</sup>, Tomoko HAMANO<sup>\*</sup>, Hiroko SHIODA<sup>\*</sup>, Ichiro YASUDA<sup>\*</sup>,  
Hiroyuki KAMAKURA<sup>\*\*</sup> and Yukihiro GOUDA<sup>\*\*</sup>

The factors of deviation in analyzing pyrethroid pesticides in crude drugs were investigated, and the following results were obtained. Although there were few differences between the processing methods of peak height and area of cypermethrin(Cyp), for quantitative analysis, the method of peak height, that is marginally influenced by impurities of its sample, was more effective. Although GC analysis was less stable compared to HPLC, it was found that the coefficient value(C.V.) of GC-ECD was at most 5 %.

It was found that pesticides in the perilla herb were unevenly distributed, so making an homogeneous powder of the sample was an important step for good repeatability analysis. In consideration of this, the C.V. value of Cyp and fenvalerate(Fen), after analyzing the uniformed powder of the perilla Herb, was 2%(n=6).

With these results achieved, we analyzed 11 kinds of crude drugs, in 121 commercial samples collected in Japan. Fen was detected in 24 samples and Cyp was detected in 13 samples. It was also suggested that suitable processing methods such as pulverization, extraction, and more detailed examination of the analysis method are required for each crude drug from now on.

**Keywords** : 生薬 crude drugs, 残留農薬 pesticide residue, ピレスロイド系農薬 pyrethroid pesticide, 電子捕獲検出器付きガスクロマトグラフ GC-ECD, 測定値のばらつき repeatability, ソヨウ Perilla Herb

### 緒 言

平成 15 年 6 月, 生薬中の農薬の残留実態に関する記事が新聞に掲載されたことから, 東京都でも都内に流通する生薬について残留農薬の調査を実施し, 前報<sup>1)</sup>で結果を報告した.

一方, 厚生労働省においては, 国内流通生薬についての実態を明らかにすることを目的として, 国立医薬品食品衛生研究所生薬部を中心とした研究班を発足させた. この中で当センター生薬研究室はピレスロイド系農薬の分析担当として参加した. 分析に当たっては, 一連の操作から生じるばらつきについてあらかじめ検証する必要があると考え, まずその検討を行うこととした. 即ち, 残留農薬の分析は煩雑な前処理により試験溶液を調製し, しかも測定する化合物の濃度は ppm レベルと微量であるため, 測定値に大きなばらつきが生じることが予想される. このような分析におけるばらつきの検証は十分に行われていないことから,

我々はばらつきの原因と考えられる分析機器, 測定濃度及び抽出手技に着目した. 具体的には同方生薬で残留農薬の報告があるソヨウを用い, 分析機器の相違によるばらつきは GC-ECD, GC-FID, HPLC による分析値と比較し検討した. 測定濃度の違いによるばらつきは, 低濃度のシベルメトリン(Cyp), フェンバレレート(Fen)とソヨウ中に高濃度に含有されるアピゲニン(Api), ペリラルアルデヒド(Per)との分析値を比較し検討した. 更に抽出手技についてもばらつきの程度を検証した.

また, 研究班共通試料である生薬 11 品目 121 検体について Cyp, Fen, ペルメトリン(Perm)の含量を測定し, 検討の結果得られた知見をもとに考察を行った.

### 実験の部

#### 1. 試料, 試薬及び機器

分析試料: 日局ソヨウを粉末とし用いた.

\* 東京都健康安全研究センター医薬品部医薬品研究科 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

\*\* 国立医薬品食品衛生研究所生薬部

研究班共通試料：全国から生薬 11 品目(ケイヒ, オウギ, ビワヨウ, オンジ, ボタンピ, サイシン, サンシュユ, ソヨウ, チンピ, タイソウ, カンゾウ)を 11 検体(No.1~11)ずつ計 121 検体収集し, それぞれ約 50 g をとり粉末とした。

標準品及び試薬：Cyp, Fen, Perm は和光純薬製残留農薬試験用, Per はシグマ社製, Api はエクストラシンセース社製を使用した。試薬は残留農薬試験用及び特級を用いた。機器：粉碎器；平工製作所製サンプルミル TI-100, GC-ECD；アジレント社製 HP6800 システム, GC-FID；島津製作所製 GC-17A システム, GC-MS；アジレント社製 HP6890N GC/HP 5973N MS, サーモエレクトロン社製 Trace GC2000/Trace MS, HPLC-PDA；ポンプ 日本分光製 880-PU, カラムオープン 同 860-CO, システムコントローラー 同 802-SC, オートサンプラー 同 851-AS, 検出器 Waters 製 996 フォトダイオードアレイ, ワークステーション 同ミレニアム 2010J。

## 2. 残留農薬分析

試験溶液の調製は日本薬局方<sup>2,3)</sup>, 衛生試験法<sup>4)</sup>, 残留農薬迅速分析法<sup>5)</sup>に記載される方法に準じ実施した。分析試料約 5.0 g を正確に量り, アセトン・水混液(5:2)を 30 mL に加え, 振とう抽出を 15 分間行った後, 遠心分離(3,000 rpm, 5 分間)し, 上澄液をガラスウールに通しろ過した。残さについて, 更に 2 回同様の処理を行い, 上澄液を合わせ, アセトン臭がなくなるまで減圧留去した。これに *n*-ヘキサンで洗浄した 10 %塩化ナトリウム溶液 100 mL をに加え, *n*-ヘキサン 50 mL ずつで, 5 分間の振とうによる液-液分配を 2 回行った。*n*-ヘキサン層を合し, 無水硫酸ナトリウムで脱水しろ過した。無水硫酸ナトリウムは *n*-ヘキサン 10 mL ずつで 3 回洗い, ろ液と合わせ減圧留去を行った。残留物に *n*-ヘキサン 25 mL 及び *n*-ヘキサンで飽和したアセトニトリル 30 mL をに加え 10 分間液-液分配を行った。さらにこの操作を 2 回繰り返した後, アセトニトリル層を合し, アセトニトリルで飽和した *n*-ヘキサン 50 mL で洗浄した。アセトニトリル層を分別し, 留去した後, 残留物に *n*-ヘキサン 2.5 mL を正確に加え, 十分溶解させた。その 1 mL を正確に量り, あらかじめ *n*-ヘキサン 5 mL, ジエチルエーテル 8 mL, *n*-ヘキサン 8 mL の順で洗浄したフロリジルミニカラムに負荷した。*n*-ヘキサン 5 mL で洗浄後, *n*-ヘキサン・ジエチルエーテル混液(17:3)で溶出し, 溶出液を減圧乾固後, 残留物に *n*-ヘキサン 1 mL を正確に加え試験溶液とした。

分析は前報<sup>1)</sup>に準じ, GC-MS による定性分析を行った後, GC-ECD を用い, ピーク高さによる絶対検量線法で定量を行った。分析条件は Fig.1 に示し, 定量限界を 0.01ppm, 検出限界を 0.005ppm とした。研究班共通試料についても, 同様に分析した。なお, Fen 及び Perm は 2 つの異性体, Cyp は 4 つの異性体のピークが出現するが, いずれも分析後に再解析し, 基線からの高さの総和を定量に用いた。

## 3. 成分分析

**Per** 分析試料約 1.0 g を正確に量り, *n*-ヘキサン 10 mL を加え超音波抽出を 20 分間行い, 遠心分離(3,000 rpm, 10 分間)を行って, 上澄液を分別した。残さに同じ処理を行い, 上澄液を合わせ, 同液で全量を正確に 25 mL とし, その一部を 0.45  $\mu$ m のフィルターに通して試験溶液とした。分析は GC-FID を用い, ピーク高さによる絶対検量線法で定量を行った。分析条件: カラム, DB-1, 30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m; キャリアガス, He; カラム温度, 100 (3 min) 10 / min 250 (1 min)。

**Api** 分析試料約 1.0 g を正確に量りメタノール 20 mL を加え, 振とう抽出を 30 分間行った後, 遠心分離(3,000 rpm, 10 分間)を行って, 上澄液を分別した。残さに同じ処理を行い, 上澄液を合わせ減圧乾固した。残留物にメタノール 2.5 mL を正確に加え, 十分溶解させた後, その一部を 0.45  $\mu$ m のフィルターに通して試験溶液とした。分析は HPLC-PDA を用い, ピーク高さによる絶対検量線法で定量を行った。分析条件: カラム, TSKgel ODS-100S, 4.6 $\times$ 150 mm, 5  $\mu$ m; カラム温度, 40 ; 移動相, H<sub>2</sub>O : MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (800:200:1); 流速, 1.0 mL / min; 検出, UV(340 nm)。

## 4. 標準溶液の調製

生薬中の残留農薬分析 Cyp, Fen 及び Perm 約 50 mg を正確に量り, *n*-ヘキサンにて正確に全量 50 mL とし, 更に同液で希釈した約 0.2 ppm 溶液を標準溶液とした。

成分分析 Per は約 50 mg を正確に量り *n*-ヘキサンにて全量 50 mL とし, 更に同液で希釈を行った約 60 ppm 溶液を標準溶液とした。Api は約 10 mg を正確に量りメタノールで正確に 50 mL とし, 更に同液で希釈を行った約 4 ppm 溶液を標準溶液とした。

## 結 果

### 1. GC 分析におけるピーク波形処理方法の検討

Fig.1 にソヨウの GC-ECD クロマトグラムを示した。Fig.1 から明らかなように, Cyp の 4 つの異性体のピーク分離が十分でないため, 波形処理方法(A:谷渡り, B:基線)によりピーク面積または高さの総和はばらつく可能性が懸念された。そこでソヨウの同一試験溶液を 6 回連続分析し, 変動係数(以下 C.V.)を求めた。その結果, 処理方法 A による面積と高さの C.V.は約 5 %であり, 一方処理方法 B によるそれも同程度であったことから, 波形処理によるばらつきは少ないと考えられた。しかし, 試験溶液において, Cyp のひとつめのピーク直後に標準溶液には見られない分離不十分な微小ピークが出現しており, 処理方法 A の谷渡りによる処理を行った場合には, 標準溶液の処理方法(Fig.1-C)との違いから生じる真値からのずれが懸念された。これらのことから波形処理は, ピークの分離状況の影響を受けにくい処理方法 B が適切であると判断した。またピーク面積法では, 夾雑物由来の面積も量り込み, 定量値

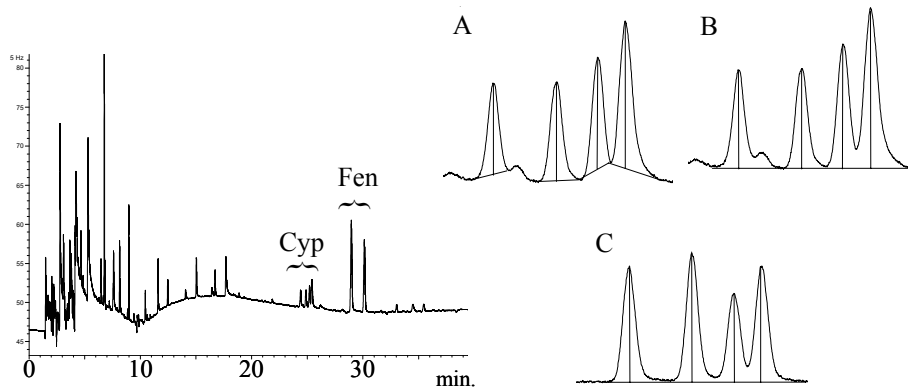


Fig.1 GC-ECD Chromatogram of Cyp and Fen in Perilla Herb

GC conditions : Column, HP-5, 0.25mm i.d. × 30m, 0.25 μm (Agilent); Carrier gas, He;  
Column temp., 160 °C-230°C/4°C(8)- 290 °C/10°C(2) ; Inlet temp., 250°C; Det. temp., 300°C;  
Split ratio; 10:1, Column flow; 3.5mL/min.(constant flow), Make up gas; N<sub>2</sub>, Inj. vol. 1 μL.

A: Cyp in test soln. treated by way of valley to valley; B: Cyp in test soln. treated by way of base line; C: Cyp in std. soln..

に誤差を与える原因となるため、ピーク高さ法を用いて定量を行うことにした。なお、Fen については2つの異性体の分離状況が良好であることから、誤差の生まれる可能性は少ないと判断された。

## 2. 分析機器及び測定濃度によるばらつきの検討

一般に農薬の分析は低濃度までの分析が求められるが、今回のピレスロイド系農薬の分析には低濃度分析が可能なGC-ECDを用いた。そして分析法のばらつきを評価するために、日局ソヨウを用いて、ソヨウに残留するCyp及びFenとソヨウ成分であるPer及びApiについてオートサンプラーによる連続6回分析を行い、そのC.V.を比較した。Per及びApiはソヨウ中にppmオーダーで含まれ、GC-FIDまたはHPLC-UVにより測定されることから、これら分析機器及び含有濃度の差異によるばらつきを比較検討した。その結果をTable 1に示す。分析機器によるC.V.を比較すると、HPLCに比べGCが明らかに高い結果となった。GC分析のC.V.を低く抑えるためには、内部標準法の採用が望ましいが、実際には個々の試料に由来する夾雑物と内部標準物質との分離が困難であるため、今回は採用できなかった。また本分析においては低濃度の農薬分析と高濃度の成分分析のC.V.はほぼ同程度で差異はほとんど認められなかった。なお、試験溶液のC.V.は標準溶液よりも高い結果となったが、これは試料に由来する夾雑物の影響によりピーク分離が悪くなったため、分析上避けられない事象と考えられる。以上の検討結果から、今回測定した試験溶液のGC-ECDによるC.V.は最大でも5%程度であることが判明した。

## 3. 分析法全行程におけるばらつき

次に、前処理から測定までの分析全行程におけるばらつきについて検討した。日局ソヨウ粉末を十分攪拌して均質

Table 1. Comparison among Repeatability<sup>a)</sup> of Cyp, Fen, Per and Api in Perilla Herb Detected by Different Instrument

Comp.	Instrument	Test Soln.		Std Soln.	
		Conc.(ppm)	C.V. (%)	Conc.(ppm)	C.V. (%)
Pesticide					
Cyp	GC-ECD	0.2	5.3	0.2	1.9
Fen	GC-ECD	0.2	3.0	0.2	2.2
Natural compounds					
Per	GC-FID	62	3.4	64	3.2
Api	HPLC-UV	4	1.5	4	1.0

a) n=6

Table 2. Repeatability of Cyp and Fen Contents<sup>a)</sup> in Uniformed Powder of Perilla Herb

No.	Cyp	Fen
1	0.70	1.68
2	0.68	1.62
3	0.68	1.63
4	0.69	1.63
5	0.70	1.66
6	0.72	1.72
Average	0.70	1.66
S.D.	0.02	0.04
C.V.(%)	2.2	2.3

a) ppm

とした分析試料約50gから、6回繰り返しサンプリングを行い、それぞれについて試験溶液を調製し、Cyp及びFen含量とばらつきを求めた。その結果をTable 2に示す。Cyp含量は平均0.70 ppm、C.V.は2.2%であり、Fen含量は平均1.66 ppm、C.V.は2.3%であった。今回採用した残留農薬測定用試験溶液の調製は行程が長く、操作も煩雑であることから、一定の精度で試験溶液が調製できるか懸念されたが、今回の結果から少なくとも試料が均質であれば一定の精度が確保できることが実証された。しかし、Zuin

ら<sup>6)</sup>によれば,ひとつの測定方法が他の生薬の残留農薬に適用できるかどうかは必ずしも現段階ではいえないことから,今回の結果がそのまま他の生薬に適用できるとは考えにくい面がある.従って,正確な残留農薬の測定には,個々の生薬毎に詳細な検討が必要と考えている.

#### 4. 生薬における残留農薬の偏在について

生薬に残留する農薬は部位によって偏在することが予想されたことから,全形のソヨウを葉と枝先に分け,葉は異なる6ヶ所から,枝先は異なる3ヶ所から約1.5gずつサンプリングし,それぞれについてCyp及びFenを測定した.その結果をTable 3に示す.葉と枝先では表面積の違いから,残留する農薬の含量は葉に高く,枝先には低いと予想されるが,今回の分析結果では,大きな差は認められなかった.また,そのばらつきの程度は,CypまたはFenいずれにおいても,枝先よりも葉に大きい傾向があったが,いずれにおいてもTable 2に示す均質化した試料のそれよりもC.V. 17.6~78.0%と明らかに高く,Cyp及びFenは生

Table 3. Cyp and Fen Contents<sup>a)</sup> in Leaves and Twigs of Perilla Herb

Comp.	Leaves <sup>b)</sup>		Twigs <sup>c)</sup>	
	Average	C.V. (%)	Average	C.V. (%)
Cyp	0.40	59.0	0.34	40.8
Fen	1.00	78.0	0.88	17.6

a) ppm b) n=6 c) n=3

薬中で偏在していることが確認された.従って,残留農薬を測定する際には,均質な試料を調製することが肝要である.

#### 5. 研究班共通試料の分析結果

生薬 11 品目 121 検体の分析結果をTable 4に示した.生薬毎の農薬の検出頻度を見ると,タイソウ(J)が最も高く,11 検体中 9 検体から検出され,次いで葉類生薬のビワヨウ(C),ソヨウ(H)が 6 検体,4 検体の順であった.農薬の種

Table 4. Pesticide Residue Contents<sup>a)</sup> in Crude Drugs<sup>b)</sup>

Comp.	No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Cyp	1	— <sup>c)</sup>	—	—	—	—	—	—	0.17	—	0.05	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.08	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.05	—
	4	—	—	0.12	—	—	—	—	—	—	0.04	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.08	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.07	—
	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.02	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	0.43	—	0.08	—
	10	—	—	0.25	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.06	—
Fen	1	—	—	0.12	—	—	—	—	—	—	0.31	—
	2	—	—	0.26	—	—	—	—	—	—	0.17	—
	3	—	—	0.08	0.57	—	—	—	—	—	0.11	—
	4	—	—	0.14	—	—	—	—	—	—	0.16	—
	5	—	—	—	0.49	—	—	—	—	—	0.24	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	0.17	—	—	—
	7	—	—	0.44	0.72	—	—	—	—	—	0.30	—
	8	—	0.12	—	—	—	—	—	—	0.08	0.11	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	1.33	—	0.20	—
	10	—	—	0.33	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—	—	1.33	0.11	0.24	—
Perm	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	0.01	—	—	—	—	0.06	—	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	0.07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

a) ppm

b) A; Cinnamon Bark(ケイヒ), B; Astragalus Root(オウギ), C; Eriobotryae Folium(ビワヨウ), D; Polygala Root(オンジ), E; Moutan Bark(ボタンピ), F; Asiasarum Root(サイシン), G; Corni Fructus(サンシュユ), H; Perilla Herb(ソヨウ), I; Citrus Unshiu Peel(チンピ), J; Jujube(タイソウ), K; Glycyrrhizae Radix(カンゾウ)

c) not detected

類順では, Fen が 121 検体中 24 検体と最も多く検出され, Cyp は 13 検体から検出された. Perm は Fen や Cyp と同様に殺虫スペクトルが広い農薬<sup>7)</sup>であるが, 検出頻度は極めて低かった.

### 考 察

生薬中のピレスロイド系農薬分析における分析値のばらつき要因を検討した. その結果, 分析機器, 測定濃度及び前処理を含む分析全行程におけるばらつきは大きくても 5 % 程度であることが判った.

一方, ばらつきを大きくする要因として生薬に残留する農薬の分布が偏在していることがソヨウの実験結果から判明した. 従って, 可能な限り均質な試料を調製することが, ばらつきを抑えるための最初の重要な過程と考えられる. 今回の生薬 11 品目 121 検体の分析は, 今回の実験結果を生かして可能な限り均質な試料調製に心がけたため, 得られた分析値については, ばらつきは小さいものと推察される.

しかし, タイソウのように軟質で, 粘着性に富んだものは, 粉末とした後も固まりやすく, 均質な粉末にするのが難しい. このような生薬については, 今後さらに適切な試料調製方法を検討する必要があると考える. また, サンシユウやオンジのように, 分配時に強いエマルジョンを起こす生薬があり, 我々は今回, エマルジョン層を遠心分離することで *n*-ヘキサン層を分け, 試料溶液の調製を行ったが, エマルジョンの生成が正確な分析における障害になることも考えられた. 更に, 精油や低極性色素等を多く含む生薬については, クリーンアップを工夫するなどの検討を重ねることにより, より精度の高い分析が可能となると考えられる.

また, 11 品目の生薬, 121 検体の分析の結果, 生薬に残留する農薬 Cyp, Fen 及び Perm の実態が明らかとなったが, 現在までのところそれらの残留基準値は設定されていない. しかし, 医薬品である生薬にこれらの農薬が残留することは, たとえ低濃度であっても好ましいことではない. 従って, 今後十分に検討された科学的な知見に基づき, 生薬中の農薬に関する基準を定める必要があると考える.

### ま と め

生薬中のピレスロイド系残留農薬分析におけるばらつきの要因を検討し次の結果を得た.

#### 1. 波形処理によるばらつき

Cyp の 4 つの異性体のピークの分離が十分でなく, 波形処理方法によりデ - タがばらつく可能性が懸念されたが, 実験の結果, 波形処理方法によるばらつきの差は少ないことが判った. また定量にはピ - ク面積法に比べ, 夾雑物の影響が少ないピーク高さ法が有効であった.

#### 2. 分析機器及び測定濃度によるばらつき

分析機器によるばらつきは, HPLC に比べて GC の方が高い結果となったが, GC-ECD による C.V. は最大でも 5 % 程度であることが判明した. また測定濃度は今回使用した分析機器のばらつきに対し, 大きな影響を与えるものではないことが判明した.

#### 3. 分析法全行程におけるばらつき

6 回繰り返しのサンプリングにより試験溶液を調製し, 分析者の手技が測定値に及ぼす影響について検討したところ, ソヨウにおける Cyp 及び Fen の C.V. は約 2 % であったことから, 試料が均質であれば手技においても一定の精度が確保できることが検証された.

#### 4. 生薬における残留農薬の偏在について

ソヨウを分析した結果, 生薬中の農薬は偏在していることが判明した. 残留農薬を測定する際には, 均質な試料を調製することが肝要である.

#### 5. 研究班共通試料の分析結果

11 品目 121 検体の生薬を分析したところ, Fen が 24 検体と最も検出頻度が高く, 次いで 13 検体から Cyp が検出された. 一方 Perm は Cyp や Fen に比べ検出される頻度は低かった. なお, 生薬の種類により, 粉碎や抽出等の適切な処理方法は異なることが示唆されたことから, 今後個々の生薬毎に分析方法の詳細な検討が必要である.

### 文 献

- 1) 塩田寛子, 浜野朋子, 中嶋順一, 他:東京健安研セ年報, **55**, 43-47, 2004.
- 2) 第 14 改正日本薬局方解説書, D652-654, 2001, 廣川書店, 東京.
- 3) 第 14 改正日本薬局方解説書, D862-864, 2001, 廣川書店, 東京.
- 4) 日本薬学会編衛生試験法注解 2000, 23-455, 2000, 金原榊出版, 東京.
- 5) 平成 9 年 4 月 8 日付衛化第 43 号厚生省生活衛生局長通知, 残留農薬迅速分析法, 1997.
- 6) Vania G. Zuin and Janete H. Y. Vilegas, *Phytotherapy Research*, **14**, 73-88, 2000.
- 7) 残留農薬分析法, 137, 249, 401, 544, 2002, ソフトサイエンス社, 東京.
- 8) 第 14 改正日本薬局方解説書, F-114-131, 2001, 廣川書店, 東京.