

## 多孔性ケイソウ土カラムカートリッジを用いた 生薬残留農薬分析における迅速前処理法の検討

中嶋 順一\*, 浜野 朋子\*, 塩田 寛子\*, 安田 一郎\*

### Rapid Pretreatment Using Solid Phase Extraction For Analyzing Pesticide Residues in Crude Drugs

Junichi NAKAJIMA\*, Tomoko HAMANO\*, Hiroko SHIODA\* and Ichiro YASUDA\*

To rapidly prepare test solutions for the analysis of pesticides  $\alpha$ -BHC,  $\beta$ -BHC,  $\gamma$ -BHC,  $\delta$ -BHC, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDE, cypermethrin, fenvalerate, and *cis* and *trans* permethrin in crude drugs, the use of ready-to-use cartridges filled with a macroporous diatomaceous material was investigated. This method(A) was compared with a Japanese Pharmacopeia extraction method(B) using a liquid - liquid partitioning procedure.

*N*-hexane was the most suitable solvent, and 200 mL was sufficient to elute target pesticides from the cartridges.

It was found that acetone in the aqueous sample loading solution, was the main cause of error. Allowing for this, there was no difference between methods A and B regarding recovery, contents of pesticides, or repeatability.

Compared with method B, method A was considered to be a reliable and useful extraction method because the protocol was simple, and the troublesome emulsions that were frequently observed in the liquid - liquid partitioning procedure did not occur.

**Keywords** : 迅速前処理 rapid pretreatment, 固相抽出 solid phase extraction, 生薬 crude drugs, 残留農薬 pesticide residue, 有機塩素系農薬 organochlorine pesticide, ピレスロイド系農薬 pyrethroid pesticide, 電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ GC-ECD, 繰り返し精度 repeatability

### 緒言

平成15年6月の生薬の残留農薬に関する新聞報道を契機として、現在でも引き続き生薬の残留農薬に対しては厳しい目が向けられている。我々は既に生薬中の残留農薬測定に関し、その基本となる測定値のばらつき要因や、農薬の残留実態等について調査し報告した<sup>1,2)</sup>。

一方、厚生労働省においてもこれらについての的確に対応するために、平成18年4月に公布される第15改正日本薬局方（以下JP15と略す）で、生薬中の残留農薬の分析方法が一般試験法である生薬試験法の純度試験として収載される予定である<sup>3)</sup>。これはJP14のセンナ、ニンジン<sup>4)</sup>の純度試験に採用されている方法で、生薬の粉末をアセトン・水混液で抽出し、濃縮後、塩化ナトリウム試液と*n*-ヘキサンを加えて分液ロートによる液液分配を行い、試験溶液を調製する。我々は現在までにこの方法により試験を行ってきたが、操作が煩雑で多くの時間を必要とし、更には試料によりエマルジョンを起こすものがあり、分析精度の低下をもたらす等の問題点があった<sup>1)</sup>。

今回これらの問題点を解決すべく、食品分野で使用実績のある多孔性ケイソウ土カラムカートリッジによる固相抽出<sup>4)</sup>について検討を行った。

具体的には、はじめにカートリッジを使用する上での適

切な溶出溶媒とその溶出量を検討した。次に、JP15に基準値の設定が予定されている生薬のうち、葉類としてビワヨウ、根茎類としてボタンピ、果実類としてタイソウを選択し、前処理カートリッジを用いた抽出法（以下抽出法Aとする）における回収率を、液液分配による抽出法（以下抽出法Bとする）と比較した。更に農薬が検出された生薬（ビワヨウ）を用い、抽出法A及びBの6回繰り返し精度の比較を行い、操作上の利点も合わせ、抽出法Aの有用性を検証した。なお対象とした農薬は、GC-ECDにより感度良く測定でき、かつ生薬からの検出事例<sup>1)</sup>のある農薬のうち、塩素系農薬では $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDE、ピレスロイド系農薬ではシペルメトリン（Cyp）、フェンバレレート（Fen）、ペルメトリン（Perm）とした。

### 実験の部

#### 1. 試料、試薬及び機器

**試料** 前報<sup>1)</sup>で使用した生薬3品目（ビワヨウ、ボタンピ、タイソウ）をそれぞれ約50 gをとり粉末とした。

**標準品**  $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、Cyp、Fen、*cis*及び*trans*-Permは和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を用い、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDT、*p,p'*-DDD、*p,p'*-DDEはいずれも

\* 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

Riedel-de Haën社製を用いた。

**試薬** 残留農薬試験用を用い、多孔性ケイソウ土カラムカートリッジは、エキストレールNT20（メルク社製、以下NT20と略す）を使用し、フロリジルミニカラムは、セップバックプラスフロリジルカートリッジ 910 mg（ウォーターズ社製）を用い、使用前にジエチルエーテル30 mL、*n*-ヘキサン15 mLで順次洗浄した。

**機器** 粉砕器：サンプルミルTI-100（平工製作所(株)製）、GC-ECD：HP6800システム（アジレント社製）、検知管：アセトン用気体検知管No.151L（ガステック(株)製）、小型ポンプ：INNO-β4000（ニッソー(株)製）

## 2. 残留農薬分析

1) **抽出法A（前処理カートリッジ法）** 分析試料約2.0 gを正確に量り、アセトン・水混液（5:2）を15 mL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でろ過した。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エバポレーターを用いアセトンを減圧留去した。更に小型ポンプ（吐出量約3.5 L/分）により液面が揺れる程度に空気を30分間吹きつけ、アセトンを約400 ppm以下に留去したものを少量の水を用いNT20に負荷した。なおアセトン留去の判断は、抽出液の液面付近の気体50 mLを、シリンジにより吸引し、アセトン用検知管により確認した。30分間放置後、*n*-ヘキサン200 mLでNT20から溶出させ、溶出液を減圧濃縮した。残留物は*n*-ヘキサン・ジエチルエーテル混液（17:3）3 mLに溶かし、全量をフロリジルミニカラムに負荷した。更に同液2 mLで容器を洗い、その全量をフロリジルミニカラムに負荷した。次いで*n*-ヘキサン・ジエチルエーテル混液（17:3）50 mLで溶出させ、溶出液をおだやかに減圧乾固させ、残留物に酢酸エチル1 mLを正確に加え試験溶液とした。

2) **抽出法B（液液分配法）** 抽出法A同様に抽出を行い、アセトン臭がなくなるまでエバポレーターを用いてアセトンを減圧留去した。これに*n*-ヘキサンで洗浄した塩化ナトリウム試液100 mLを加え、*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*-ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水し、ガラスウールでろ過した。ガラスウール上の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*n*-ヘキサンを減圧留去した。以降Aと同じ操作を行って試験溶液を調製した。

3) **標準溶液の調製** 各標準品約10 mgを正確に量り、*n*-ヘキサンにより溶解し、同液にて全量100 mLとしたものを標準原液とした。この一部をとり、 $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHCと $o,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDD、 $p,p'$ -DDEはいずれも各々0.5 ppm、*cis*および*trans*-Permは各々1 ppm、CypまたはFenはそれぞれ2 ppm溶液となるように*n*-ヘキサンで希釈し、12種混合標準溶液を調製した。GC用標準溶液は、生薬2 g中の濃度として0.2 ppmに相当する量が測定できるような12種混合標準溶液を*n*-ヘキサンにて5倍希釈した溶液を使

用した。

4) **添加回収率測定用試料の調製** 農薬を含まないことを確認した試料約2 gを正確に量り、添加回収用標準溶液200  $\mu$ Lを加え、30分間放置して調製した。

5) **分析条件** 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。なお条件はFig.1に示した。

## 結果および考察

### 1. カートリッジにおける溶出溶媒及び溶出量の検討

水15 mLに $\alpha$ -BHC、 $\beta$ -BHC、 $\gamma$ -BHC、 $\delta$ -BHC、 $o,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDT、 $p,p'$ -DDD、 $p,p'$ -DDE 各々0.4  $\mu$ gおよびCyp、Fen、*cis*、*trans*-Perm それぞれ2 $\mu$ g相当量の*n*-ヘキサン溶液を加え、おだやかに*n*-ヘキサンを減圧濃縮し、その水溶液全量を水2 mLで洗いながらNT20に負荷し、30分間放置後、*n*-ヘキサン、*n*-ヘキサン・ジクロロメタン混液（75:25）、（50:50）及びジクロロメタンの4種類<sup>4)</sup>の溶媒系を用い、それぞれ40 mLずつ、総量で160 mLまで溶出させ、溶媒留去後、残留物に酢酸エチル2 mLを加え分析し、各農薬の溶出挙動を確認した。

1) **溶出溶媒の決定** 検討したいずれの溶出溶媒においても、回収率の差は認められず、いずれの溶媒によっても溶出は可能と判断された。しかし、ジクロロメタンを含む溶出液では、*n*-ヘキサンのみに比べ、より多くの生薬由来の成分を溶出させ、分析の障害になることが考えられた。また塩素を含む溶媒は、環境保護の観点から使用を避けるのが望ましいという理由から、溶出溶媒を*n*-ヘキサンに決定した。

2) **溶出量の決定** 実験の結果いずれの化合物においても*n*-ヘキサンが80 mLのとき、最も多く溶出された。しかし、120 mLでも化合物はわずかに溶出され、160 mLで、理論値の98~99%が溶出された。したがって、溶出量は、目的化合物がほぼ全量溶出されると考えられる200 mLと設定した。

### 2. 抽出液中の残存アセトンによるばらつきへの影響

これまで抽出液中のアセトン留去は、アセトン臭がなくなるまで減圧留去するという方法で行っており、留去の判断に際し客観性が乏しかった。試みにアセトン臭がしないと判断されたピワヨウ濃縮液について、液面付近から気化するアセトンを検知管により測定したところ、約4,000 ppm以上のアセトンが検知されたことから、エバポレーターによる減圧濃縮では十分アセトンが除去できないことが判明した。更にこれをカラムに負荷して分析したところ、Table 1のA1に示すように変動係数（以下C.V.）が10~15%とかなり大きかった。そこで、小型ポンプを用い、抽出液に30分間空気を吹きつけた後、アセトン用検知管で確認したところ、約400 ppm以下となったことから、この操作によりアセトンが更に留去できることが分かった。この方法により、ピワヨウを用いて分析を行った結果、A2に示すようにC.V.は7~8%前後となり、ばらつきが大幅に改善された。これらことから、前処理カートリッジに負荷する溶液中の残存アセトンが分析値のばらつきに大きく影響することが明

らかとなり、アセトンを十分留去し、検知管でそれを確認  
 することが、分析精度を向上させる上で有効であると考え  
 られた。

Table 1. Comparison of Coefficient Value <sup>a)</sup> of *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, Cypermethrin, and Fenvalerate in Uniformed Powder of Eriobotryae Folium by Different Treatment (A1 and A2)

Treatment	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Cypermethrin	Fenvalerate
A1	12.0	11.6	10.6	15.0	11.6
A2	7.1	7.8	8.6	8.3	8.2

a) : n = 6, (%)

A1: Evaporating acetone by evaporater, and judged the degree of acetone by smell of it.

A2: Evaporating acetone by evaporater, followed by air treatment with small pump, and checked the residue of acetone by gas detector tube.

### 3. 異なる抽出法における回収率の比較

農薬を残留しないことが確認されたビワヨウ、ボタン  
 ビ、タイソウに、基準値として提示<sup>3)</sup>されている0.2 ppm相  
 当量の農薬を加え、抽出法AとBの回収率を2回の測定結果  
 の平均値をTable 2に示した。いずれの方法もおおむね90~  
 110%前後の回収率を示し、2回の測定値の差もほぼ5%以内  
 で、ばらつきはほとんどなかった。上路らによれば、得ら  
 れる結果の信頼性を図る時、添加回収率が70~110%の範囲  
 内に再現良く収まる必要があるとされている<sup>5)</sup>。今回の結果  
 は、A、Bいずれも良好な分析方法であると判断された。

### 4. 異なる抽出法による繰り返し測定結果の比較

既報<sup>2)</sup>で*p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, Cyp, Fen  
 が検出されたビワヨウを用い、A、Bそれぞれの抽出法に  
 ついて分析を実施した。Fig.1にそれぞれのクロマトグラフ  
 を示したが、両者に大きな差異は認められなかった。6回測  
 定による含量の平均値は、おおむね同等の値を示し、C.V.  
 は抽出法Aが7~8%、Bが3~8%であった(Table 3)。上路らに  
 よれば、農薬分析における変動係数は、10%以内に収まっ  
 ている必要があるとされるが<sup>9)</sup>、今回いずれの方法もこれを  
 十分満足していた。このことから、前処理カートリッジを  
 用いる抽出法Aは、分析精度上液液分配と比べて、そん色  
 のないものと考察された。

Table 2. Comparison of Recovery (%) <sup>a)</sup> of BHC, DDT, Perm, Cyp and Fen in Crude Drugs between Method A and B

Sample	Method	$\alpha$ -BHC	$\beta$ -BHC	$\gamma$ -BHC	$\delta$ -BHC	<i>p,p'</i> -DDE	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	<i>cis</i> -Perm	<i>trans</i> -Perm	Cyp	Fen
Eriobotryae Folium (ビワヨウ)	A	90	99	119	97	96	107	88	90	109	99	100	100
	B	89	96	118	93	95	98	84	106	90	96	112	112
Moutan Bark (ボタンビ)	A	102	100	112	101	64	90	64	78	68	67	71	85
	B	99	93	106	97	94	90	82	121	81	84	91	88
Jujube (タイソウ)	A	86	104	87	96	80	94	79	96	100	96	95	110
	B	83	97	74	100	74	94	83	124	99	104	105	103

a) Average of twice

A: Extrelut method. B:Liquid - liquid partition method.

Perm:Permethrin, Cyp: Cypermethrin, Fen: Fenvalerate.

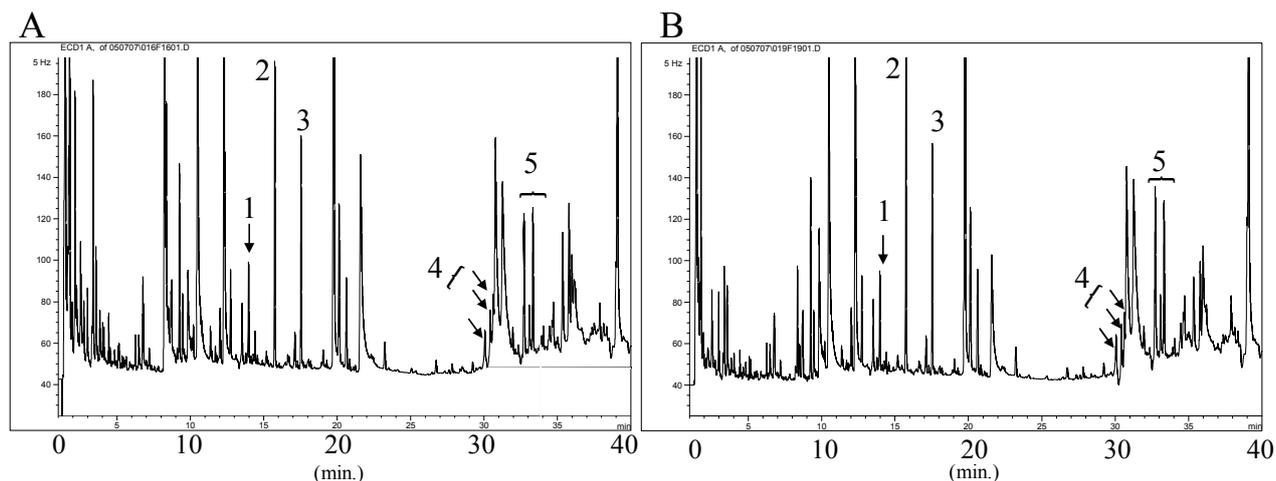


Fig. 1. GC-ECD Chromatograms of Pesticide Residue in Eriobotryae Folium by Different Preparation Method (A and B)

GC conditions : Column, HP-5, 0.25mm i.d.  $\times$  30m, 0.25  $\mu$  m (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; 1.5mL/min.(constant flow), Make up gas; N<sub>2</sub>, Inj.vol. 1  $\mu$  L.

A: Extrelute method, B: Liquid - liquid partition method, 1: *p,p'*-DDE, 2: *o,p'*-DDT, 3: *p,p'*-DDT, 4: cypermethrin, 5: fenvalerate.

Table 3. Comparison among Repeatability of *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, Cypermethrin, and Fenvalerate Contents<sup>a)</sup> (ppm) in Uniformed Powder of Eriobotryae Folium by Different Method (A and B)

Method	<i>p,p'</i> -DDE	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDT	Cypermethrin	Fenvalerate
A	0.014 <sup>a)</sup> $\pm$ 0.001 <sup>b)</sup>	0.176 $\pm$ 0.014	0.029 $\pm$ 0.003	0.330 $\pm$ 0.028	0.421 $\pm$ 0.034
B	0.015 $\pm$ 0.001	0.219 $\pm$ 0.007	0.038 $\pm$ 0.001	0.251 $\pm$ 0.010	0.490 $\pm$ 0.017

a) Average of 6 times of sampling, b) S.D.

A: Extrelute method, B: Liquid - liquid partition method.

## 5. 抽出法Aの優位性について

抽出法Bでは抽出液を塩化ナトリウム試液と*n*-ヘキサンによる分液操作があるが、試料によっては生薬特有の強いエマルジョンが形成され、二層が分離せず、次の操作に移行できない等、分析操作に支障が生じることがある。しかし、前処理カートリッジを使用した場合にはエマルジョンが形成されず、一定の操作精度が保たれる。更に分配操作は操作が煩雑で、長時間を要するが、前処理カートリッジの操作は、同時に多数の試料を迅速に処理することが可能である。これらのことから前処理カートリッジを用いる方法は、今回対象とした農薬の試験に有用な方法であると思われる。今後、これらの検討結果を踏まえ、本法の他生薬への応用の可能性について、継続して検証していきたいと考えている。

## まとめ

生薬中の残留農薬分析における市販多孔性ケイソウ土カラムカートリッジを使用した抽出法(A)と液液分配法(B)を比較し次の結果を得た。

### 1. カートリッジにおける溶出溶媒と溶出量の検討

NT20の溶出溶媒について検討した結果、溶出溶媒は*n*-ヘキサン、溶出量は200 mLと設定した。

### 2. 抽出液中の残存アセトンによるばらつきへの影響

前処理カートリッジに負荷する溶液中の残存アセトンが分析値のばらつきに大きく影響することが明らかとなった。アセトンを十分留去し、検知管でそれを確認することが、分析精度を向上させる上で有効であった。

### 3. 異なる抽出法における回収率の比較

ビワヨウ、ボタンピ、タイソウの3生薬について、試料中濃度として0.2 ppm添加時におけるA法とB法による回収率を求めたところ、いずれも良好で差異はなかった。

### 4. 抽出法A, Bの試験溶液と繰り返し精度の比較

抽出法A, Bそれぞれの方法により得られた試験溶液の

GC-ECDクロマトグラムを比較したところ、クリーンアップの効果には大きな差異は認められなかった。また繰り返し精度においてもA法はB法と比べそん色のないものであった。

#### 5. 前処理カートリッジの優位性について

抽出法Bの分液操作は、試料によってはエマルジョンが形成されるが、抽出法Aはエマルジョンが形成されず、またBの分配操作は煩雑で、長時間を要する。抽出法Aは小型ポンプによる処理や検知管によるアセトン除去の確認、NT20に負荷後30分間の放置等の行程が増えても、同時に多数の試料を迅速に処理できる。したがって、前処理カートリッジを用いる方法は、液液分配法に比べ、より優位な方法であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 中嶋順一, 塩田寛子, 浜野朋子他: 東京健安研七年報, **55**, 49-53, 2004.
- 2) 塩田寛子, 浜野朋子, 中嶋順一他: 東京健安研七年報, **55**, 43-47, 2004.
- 3) (財)日本公定書協会, 日本薬局方フォーラム, **14**(1), 21-22. 2005
- 4) Alfonso Di Muccio, Danilo Attard Barbini, and Tiziana Generali, *et al.*: *Journal of Chromatography A* **765**, 39-49, 1997.
- 5) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二: 残留農薬分析法, 14-15, 2002, ソフトサイエンス社, 東京.