

基準をより明確にする改訂を行った。改訂した確認手続き資料を資料3に示す。

なお、上述の規格は、日本薬局方の試薬・試液に新たに収載される予定であり、同じく日本薬局方に新たに収載される予定の牛車腎気丸エキスの確認試験に用いられる予定である。また、認定手続きの資料は、日本薬局方原案審議委員会生薬等(B)委員会です承され、今後のロットの更新に利用される予定である。

## 2. ゴシツの保存条件について

ゴシツ粉末の過酷条件(40°C)における4ヶ月間の保存試験の結果、サポニン成分と考えられる赤紫色に呈色するスポットが当初と比較して濃くなっていく傾向が認められた(Fig. 1)。また、粉末の色も当初と比較して濃くなっていた。しかし、室温並びに5°Cでの保存では、5ヶ月でも特に成分の変化は認められなかった。変化したサポニン成分を確認するために、chikusetsusaponin IVa, chikusetsusaponin V, 28-deglucosyl chikusetsusaponin V, oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranoside とともにTLCを行ったところ、いずれの成分のスポットも当初と比較して濃くなっており、牛車腎気丸エキスでのゴシツの確認に用いるスポットである chikusetsusaponin IVa が特に増加していた(Fig. 2)。

## 3. ガイヨウについての検討

### (1) TLC条件の検討

ガイヨウは、日本薬局方への収載が検討されている生薬であるが、特徴的な成分が見当たらないために、確認試験の設定が出来ない状態であり、標準生薬の設定が有効と思われる。ガイヨウについては、特異的な成分は見出されていないが、これまでの検討結果から、数個のTLCスポットを組み合わせるにより、確認試験の設定が可能と思われた。そこで、まず比較統一試料を作成し、この試料について抽出並びにTLCの条件を検討した。検討結果の一部をFig. 3に示す。抽出法としては、60%メタノールを用いることにより、クロロフィル関連成分の抽出が抑えられ、スポットの確認が容易になることから、この方法を採用することとし、この方法で抽出(0.2g/2mL 60%メタノール)したサンプルを、酢酸エチル/ヘキササン/酢酸混液(80:20:1)で展開し、そのま

ま並びに希硫酸を噴霧してから加熱後、蛍光を観察する(365 nm照射)方法を用いて、更に市場流通品等のパターンと生薬としての性状の違いを検討した(Fig. 3-5)。その結果、ガイヨウには特徴的な4つのスポット

(7-methoxycoumarin, umbelliferone, unknown, scopoletin)が見られ、このうち、umbelliferoneとscopoletinはほぼ全てのサンプルで確認できることから、この2成分を指標として用いることにより、類似生薬との区別が可能と思われた。また、中国産のガイヨウ(*A. argyi*)については、メタノール抽出液を用い、希硫酸噴霧後加熱してUV365で検出することにより緑色のスポットとして検出される特徴的な化合物(3,5,6,7,3',4'-hexahydroxyflavoneのテトラメチルエーテル体と推定される)が存在し、TLCでの区別が可能であることが明らかになった。更に、中国産ガイヨウ(*A. argyi*)の混入に対する純度試験の可能性を検討した結果(Fig. 6)、逆相TLCプレート(展開溶媒:アセトニトリル/水混液(1:1))で展開し、紫外線(254 nm)照射により*A. argyi*に特徴的なスポット(Fig. 6の矢印)を検出することで、*A. argyi*の10%程度の混入が確認できることが明らかとなった。

### (2) 遺伝子塩基配列の検討

日本、韓国、中国のガイヨウの遺伝子塩基配列の比較から、日本産ヨモギ(*A. princeps*)と中国産(*A. argyi*)とは、ITS領域の塩基配列が7塩基異なっており、この違いで両者を区別できることが明らかになった。一方、日本産のヨモギの中では、九州産のものの中に他とは2塩基が異なるタイプが見られたが、TLCで両者を区別することはできなかった。また、徳島産の1検体は、塩基配列が他と大きく異なっていた。この検体は、形態的には他の日本産のものと区別が困難であったが、成分的には7-methoxycoumarinのスポットが強く、umbelliferoneとscopoletinのスポットが非常に弱い特徴が見られた。

## D. 考察

本研究班で検討してきた理化学試験用標準生薬(試薬)「シャゼンシ」並びに「ゴシツ」の規格並びに更新時の確認手続き資料を完成させた。

これら2品目は、日本薬局方に記載される予定の牛車腎気丸エキス中の構成生薬の確認試験に採用されることになり、試薬として日本薬局方に記載されることになったが、これに伴い、「規格としてTLCの写真を採用する」という当初からの方針を修正する必要が生じた。TLC法は、Rf値の再現性が悪いうえ、発色試薬を用いる場合には、試薬の噴霧量や加熱方法等で発色に差が出易い、通常は標品を同時にスポットすることにより、これらの問題を解決しているが、標準生薬は、このような標品が得られないものについて設定することを前提としているため、TLCパターンを人の目で判断することにより、これらの不安定要因を排除する必要がある。しかし、試薬として日本薬局方に記載するに当たっては、TLCパターンを文字で表現する必要が生じた。そこで、研究班の委員が所属する6つの機関で行われたTLCのパターンを比較し、これらを代表するRf値を採用するとともに、従来同様「一付近」という表現とした。また、スポットの色については代表的と思われる色を採用するとともに、色の表現の統一のため、JISの色名帳に準拠した表現とした。なお、日本薬局方医薬品各条の生薬に関する規定の中で用いられている色には慣用的な表現が用いられており、JISの色名帳に準拠した色の表現は、試薬としての規格に関連する部分のみとしておく必要がある。

理化学試験用標準生薬(試薬)の更新時の手続き資料については、写真をより良いものに差し替える等の改善を行った。シャゼンシについては、現在市場に流通しているシャゼンシを採用しているが、この資料の手順に従うことにより、基原植物の確認とTLCパターンの適合性の評価が確実に行える。一方、ゴシツについては、医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で栽培したものが当面採用される予定であり、基原植物が明確であるが、それ以外の植物を採用する場合にも、この資料で対応可能である。なお、この資料は、日本薬局方原案審議委員会生薬等(B)委員会承認され、その内部資料として今後利用される予定である。

薄層クロマトグラフィー用試薬としてのシャゼンシは全形のまま供給され、その状態での成分

の安定性は、これまでの検討から問題が無いことが確認されている。ゴシツについては、粉末の状態では5℃並びに室温で5ヶ月間保存しても、TLCパターンに変化は見られなかった。しかし、40℃で保存した場合には、赤紫色に発色するサポニン成分のTLCパターンに変化が見られた。変化は、指標成分として用いるスポットが濃くなる方向に進んでおり、局方試験に用いる試薬としての実用上の問題は無い。しかし、粉末の色も徐々に変化しているため品質管理の面では問題があるため、ゴシツは低温で保存することが必要である。

ガイヨウには特異的な成分が知られていないことから、生薬自体の確認試験に用いる試薬として標準生薬「ガイヨウ」を設定することが有効と考えられた。そこで、種々のTLC条件を用いて市場品並びに類似生薬を比較検討した結果、単一の成分の有無をTLC上で確認することによってガイヨウを確認することはできないが、複数のスポットの有無を確認することで、ガイヨウと類似の生薬を判別することが可能であると考えられた。このような判別に適した条件としては、60%メタノールで抽出したサンプルを、酢酸エチル/ヘキサン/酢酸混液(80:20:1)で展開し、そのまま或は希硫酸を噴霧してから加熱後、蛍光を観察する(365nm照射)方法があり、このTLCのパターンで、ガイヨウと他の生薬を明確に区別できた。このTLC条件で判別のポイントとなるのは、7-methoxycoumarin, umbelliferone, scopoletinとumbelliferoneとscopoletinの間にある化合物(未同定)であるが、これらの化合物が総てのサンプルに共通して現れるわけではなかった。即ち、umbelliferoneとscopoletinはほとんどのサンプルに認められたが、これらがほとんど認められず、代わりに7-methoxycoumarinが強く現れるサンプルもあった。従って、判別の基準としてどのようなスポットの組み合わせを用いるかが課題である。このような課題はあるものの、このTLC条件を用い、上記の4つのスポットを示す生薬を標準生薬に設定することにより、ガイヨウの確認試験を設定することは可能である。また、上記の4つの化合物のいくつかを指標として利用することにより、標準生薬を設定しなくても、ガイヨウの確認試験を設定することが可能である

ものと考えられる。いずれにせよ、ガイヨウの確認試験の設定には、基原植物種の確実なサンプルについて、更に TLC パターンを検討することが必要であり、形態的な特徴並びに遺伝子による鑑別等も含め、更に検討する必要がある。

なお、今回の検討で、日本のガイヨウとは基原植物が異なる中国産のもの (*A. argyi*) の混入を TLC で検出できることが明らかになったが、確実な純度試験とするためには、ガイヨウの標準生薬とともに、*A. argyi* の標準品を同時にスポットすることが必要であると思われる。

## E. 結論

生薬シャゼンシ並びにゴシツについて、理化学試験の分析標品として用いるための標準生薬の規格並びにその認定手続きを作成し、これを基にして日本薬局方に試薬として収載される薄層クロマトグラフィー用ゴシツ並びにシャゼンシの規格を作成した。ここで作成した規格に適合するゴシツ並びにシャゼンシは、日本薬局方への収載が予定されている牛車腎気丸エキスの確認試験に試薬として利用される予定である。一方、生薬ガイヨウについて、標準生薬設定のための TLC 条件等の検討を行い、標準生薬の設定に適した条件を見出したが、この条件は、標準生薬を用いない従来の確認試験法の条件としても利用可能であるとともに、日本のガイヨウとは基原植物が異なる中国産のもの (*A. argyi*) に対する純度試験としても利用できるものと思われる。

## (参考文献)

1. a) 「平成 10 年度 理化学試験用生薬標準品研究班」総括研究報告書, *医薬品研究*, **31**(11), 836 (2000); b) 「平成 11 年度 理化学試験用生薬標準品研究班」総括研究報告書, *医薬品研究*, **31**(11), 837-841 (2000); c) 「平成 12 年度 理化学試験用生薬標準品研究班」総括研究報告書, *医薬品研究*, **35**(9), 461-465 (2004); d) 「平成 13 年度 理化学試験用生薬標準品研究班」総括研究報告書, *医薬品研究*, **35**(9), 466-468 (2004).
2. 鄭太坤ら, 車前草の生薬学的研究 (第 8 報) 『中国産オオバコ属植物の根の形態について』,

*生薬学雑誌*, **45**, 93-98 (1991).

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Y. Goda, N. Kawahara, F. Kiuchi, K. Hirakura, Y. Kikuchi, H. Nishimura, M. Takao, M. Marumoto, H. Kitazaki, A guanidine derivative from seeds of *Plantago asiatica*. *J. Natural Medicines*, **63** (1), 58-60 (2009).

### 2. 学会発表

- 1) 瀧野裕之, 菱田敦之, 木内文之: ゴシツの加工調製に関する研究. 日本生薬学会第 55 回年会, 2008 年 9 月 (長崎).
- 2) FumiYuki KIUCHI: Recent Topics in the Japanese Pharmacopoeia Regulation. International Symposium on Harmonization of Herbal Medicines, 2008 年 11 月 (韓国, ソウル).
- 3) 木内文之: 局方生薬試験に関する最近の話題. 第 37 回生薬分析シンポジウム, 2008 年 12 月 (大阪).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

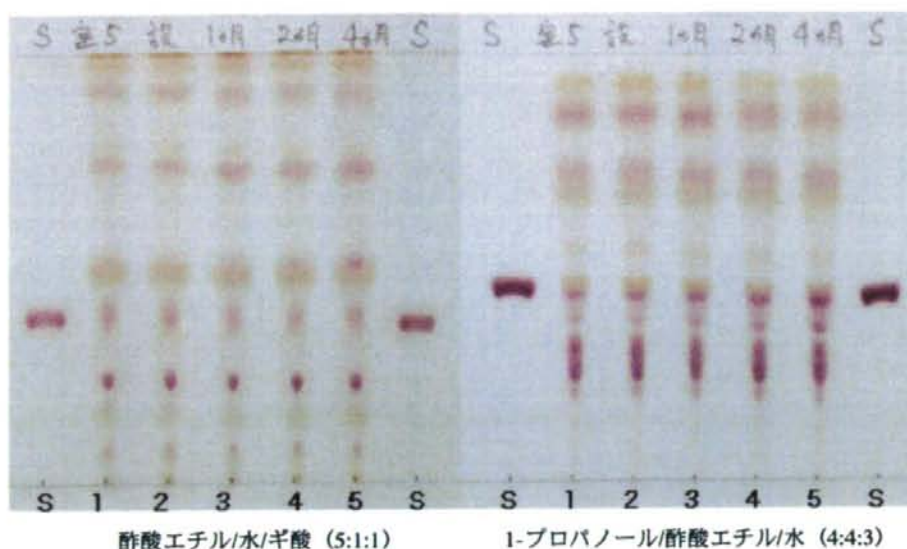


Fig. 1. ゴシツの室温並びに 40°C 保存における TLC パターンの変化

S: チクセツサポニン IV, 1: 室温 5ヶ月後, 2: 設定時, 3: 40°C 1ヶ月後,  
4: 40°C 2ヶ月後, 5: 40°C 4ヶ月後

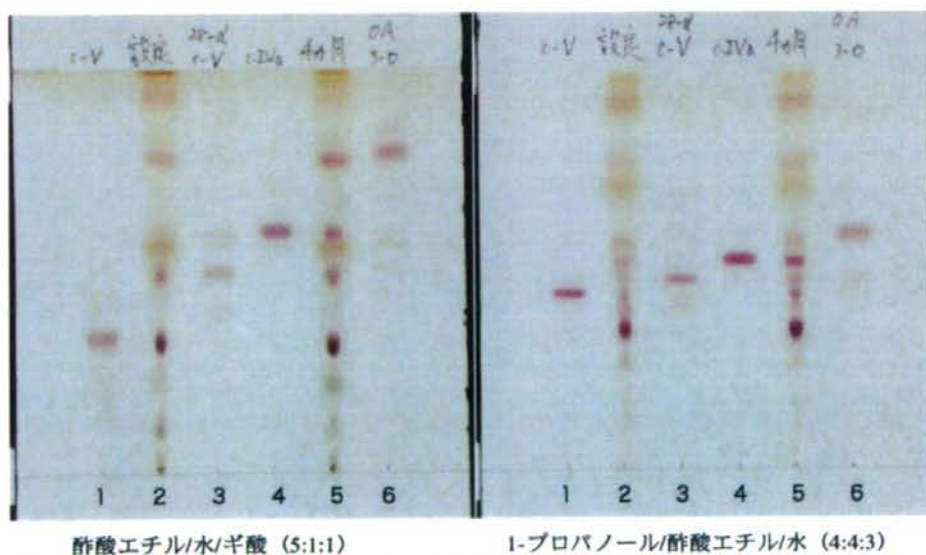


Fig. 2. ゴシツを 40°C で保存した際に変化する成分の確認

1: chikusetsusaponin V, 2: ゴシツ (設定時), 3: 28-deglucosyl chikusetsusaponin V  
4: chikusetsusaponin IVa, 5: ゴシツ (40°C, 4ヶ月保存),  
6: oleanolic acid 3-O-β-D-glucopyranoside

Fig. 3. 抽出並びにTLC条件の検討と類似生薬との比較

- a: 酢酸エチル/水/メタノール混液 (7:2:2)  
60%メタノール抽出, 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射
- b: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸混液 (80:20:1)  
メタノール抽出, 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射
- c: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸混液 (80:20:1)  
60%メタノール抽出, 365 nm 照射
- d: 酢酸エチル/ヘキサン/酢酸混液 (80:20:1)  
60%メタノール抽出, 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射
- e: ヘキサン/アセトン混液 (3:2)  
60%メタノール抽出, 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射
- f: ジエチルエーテル/ヘキサン混液 (5:1)  
60%メタノール抽出, 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射

- | サンプル                 |  |
|----------------------|--|
| 1. ガイヨウ-1            |  |
| 2. ガイヨウ-2            |  |
| 3. ガイヨウ-3            |  |
| 4. ガイヨウ-4 (岩手)       |  |
| 5. ガイヨウ-5 (徳島)       |  |
| 6. ガイヨウ-6 (九州)       |  |
| 7. ガイヨウ-7 (新潟)       |  |
| 8. ガイヨウ (統一サンプル)     |  |
| 9. インチンコウ            |  |
| 10. ピワヨウ             |  |
| 11. チャヨウ             |  |
| 12. ニンドウ             |  |
| 13. ハッカ              |  |
| 14. インヨウカク (キハナカリソウ) |  |
| 15. インヨウカク (トキイカリソウ) |  |
| 16. ソヨウ (日本)         |  |
| 17. ソヨウ (広東)         |  |
| 18. ヤクモソウ            |  |

7-methoxycoumarin  
umbelliferone  
unknown  
scopoletin

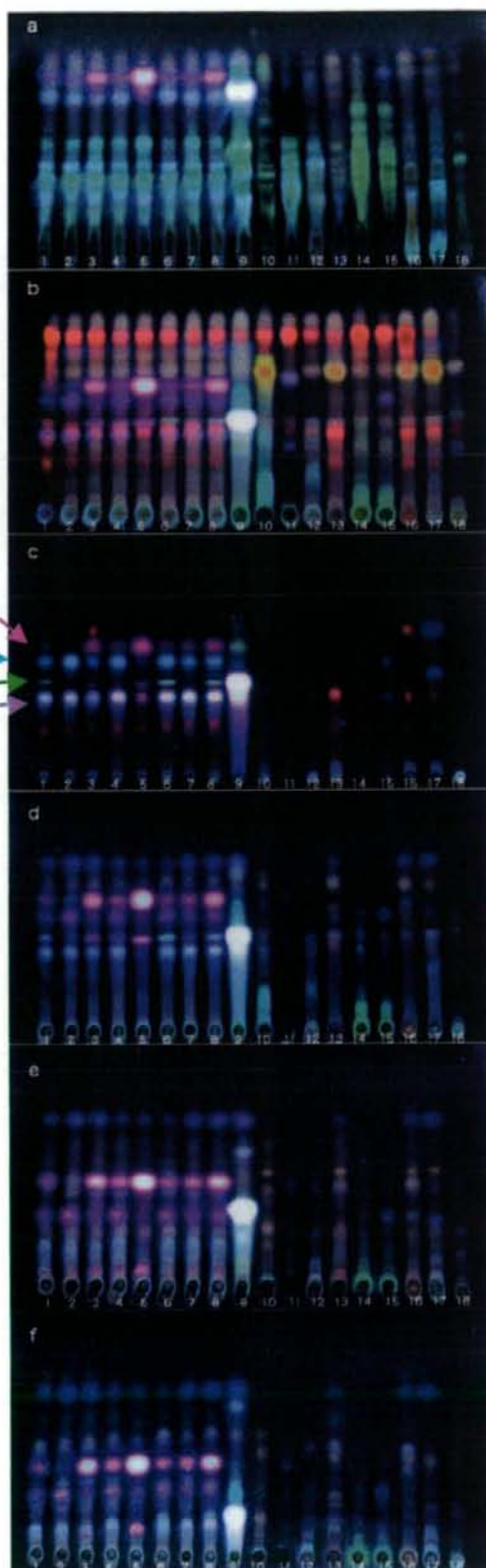


Fig. 4. ガイヨウの市場品並びに類似生薬の比較

展開溶媒:

酢酸エチル/ヘキサン/酢酸 (80:20:1)

検出: 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射

ガイヨウサンプルの産地と入手時期

1. 日本・長野, 2007.11入手
2. 日本・四国, 2006.8入手
3. 日本・四国, 2006.7入手
4. 日本・徳島, 2006.4入手
5. 日本, 2005.6入手
6. 韓国, 2007.6入手
7. 韓国, 2006.9入手
8. 韓国, 2004.7入手
9. 韓国, 2003.7入手
10. 韓国, 2002.7入手
11. 韓国, 2000.7入手
12. 中国・四川省 (基原植物が異なる), 2007.5入手;
13. 中国・四川省 (基原植物が異なる), 2008.4入手
14. 日本・長野, 2008.2入手

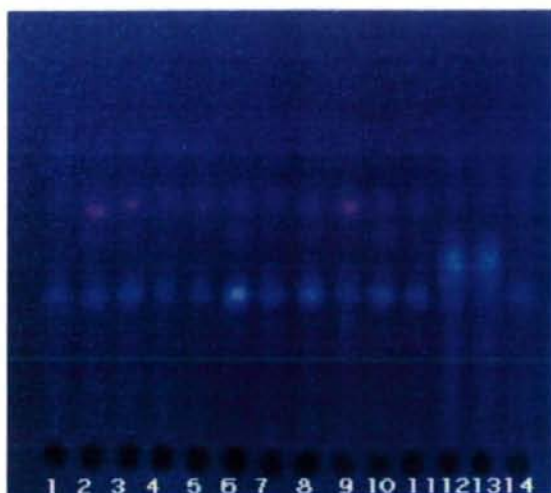


Fig. 5. ガイヨウと類似生薬との比較

展開溶媒:

酢酸エチル/ヘキサン/酢酸 (80:20:1)

検出: 希硫酸噴霧加熱後365 nm 照射

1. ガイヨウ (統一サンプル: 日本・四国産, 2006.8入手)
2. インチンコウ (日本・徳島産)
3. インチンコウ (日本・長野産)
4. インチンコウ (中国産)
5. セイコウ (青蒿: 中国・四川産)

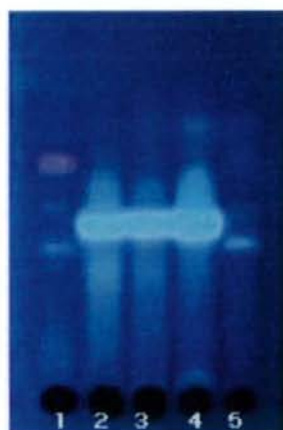
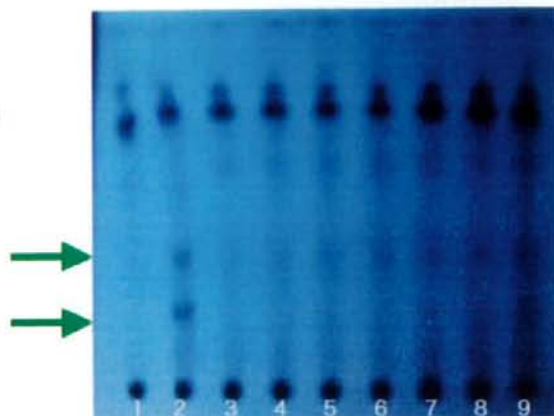


Fig. 6. 中国産 (*A. argyi*) の混入の検出

プレート: RP-18 F254S

展開溶媒: アセトニトリル/水 (1:1)

1. ガイヨウ (統一サンプル: 日本・四国産)
2. 中国産 (*A. argyi*)
3. 中国産 (*A. argyi*) 1%含有
4. 中国産 (*A. argyi*) 2%含有
5. 中国産 (*A. argyi*) 3%含有
6. 中国産 (*A. argyi*) 4%含有
7. 中国産 (*A. argyi*) 5%含有
8. 中国産 (*A. argyi*) 10%含有
9. 中国産 (*A. argyi*) 20%含有



## ゴシツ、薄層クロマトグラフィー用 規格

ゴシツ、薄層クロマトグラフィー用 ヒナタイノコズチ *Achyranthes fauriei* Leveillé et Vaniot (Amaranthaceae) の根を加熱乾燥後粉末としたものである。ただし、次の試験に適合するもの。

## 確認試験

(1) 本品の細末2g をとり、水10 mL を加えて10 分間振り混ぜた後、1-ブタノール5 mL を加えて10 分間振り混ぜ、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。別に薄層クロマトグラフィー用チクセツサポニンIV1 mg をメタノール1 mL に溶かし、標準溶液とする。これらの液につき、薄層クロマトグラフィー (2.03) により試験を行う。試料溶液及び標準溶液10 mL ずつを薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次に酢酸エチル/水/ギ酸混液 (5 : 1 : 1) を展開溶媒として約10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに希硫酸を均等に噴霧し、105℃で10 分間加熱するとき、標準溶液ではこい紫みの赤のスポットをR<sub>f</sub>値0.35 付近に認め、試料溶液では以下と同等のスポットを認める。

R <sub>f</sub> 値	スポットの色及び形状
0 付近	黒の弱いスポット
0.1 付近	つよい紫みの赤の弱いスポット
0.2 付近	つよい紫みの赤のテーリングした弱いスポット
0.25 付近	こい紫みの赤の強いスポット
0.35 付近	こい紫みの赤のリーディングしたスポット
0.45 付近	くすんだ黄の弱いスポット
0.5 付近	灰みの紫みを帯びた赤の弱いスポット
0.75 付近	灰みの赤の弱いスポット
0.9 付近	くすんだ赤の弱いスポット

(2) (1) の試験条件を準用する。ただし、展開溶媒に1-プロパノール/酢酸エチル/水混液 (4 : 4 : 3) を用いて試験を行うとき、標準溶液ではこい紫みの赤のスポットをR<sub>f</sub>値0.45 付近に認め、試料溶液では以下と同等のスポットを認める。

R <sub>f</sub> 値	スポットの色及び形状
0.25 付近	つよい紫みの赤の弱いスポット
0.25 ~ 0.3 付近	こい紫みの赤のリーディングしたあるいは2個の強いスポット
0.35 付近	こい紫みの赤のスポット
0.4 付近	くすんだ赤の弱いスポット
0.42 付近	暗い赤のスポット
0.45 付近	灰みの赤の弱いスポット
0.65 付近	くすんだ緑みの黄の弱いスポット
0.7 付近	灰みの赤の弱いスポット
0.85 付近	灰みの赤の弱いスポット
0.95 付近	くすんだ黄赤の弱いスポット

## シャゼンシ、薄層クロマトグラフィー用 規格

シャゼンシ、薄層クロマトグラフィー用〔医薬品各条、「シャゼンシ」ただし、次の試験に適合するもの〕  
確認試験

(1) 本品の細末1g をとり、メタノール3 mL を加え、水浴上で3 分間加温する。冷後、遠心分離し、上澄液を試料溶液とする。この液につき、薄層クロマトグラフィー(2.03)により試験を行う。試料溶液10 mL を薄層クロマトグラフィー用シリカゲルを用いて調製した薄層板にスポットする。次にアセトン/酢酸エチル/水/酢酸(100)混液(10:10:3:1)を展開溶媒として約10 cm 展開した後、薄層板を風乾する。これに4-メトキシベンズアルデヒド・硫酸試液を均等に噴霧し、105℃で10 分間加熱するとき、以下と同等のスポットを認める。

Rf 値	スポットの色及び形状
0 付近	ごく暗い青の強いスポット
0.08 付近	ごく暗い青のスポット
0.1 ~ 0.2 付近	ごく暗い青のリーディングしたスポット
0.25 付近	こい青の強いスポット(ブランタゴグアニジン酸に相当)
0.35 付近	暗い灰みの青の強いスポット(ゲニボシド酸に相当)
0.45 付近	灰みの黄みを帯びた緑の弱いスポット
0.50 付近	こい黄緑の強いスポット(アクテオシドに相当)
0.6 付近	うすい青の弱いスポット
0.85 付近	こい青のスポット
0.9 ~ 0.95 付近	灰みの青のテーリングしたスポット

(2) (1) の試験条件を準用する。ただし、展開溶媒に酢酸エチル/水/酢酸混液(6:1:1)を用いて試験を行うとき、以下と同等のスポットを認める。

Rf 値	スポットの色及び形状
0 付近	黄緑みの暗い灰色のスポット
0.05 付近	暗い灰みの黄緑の弱いスポット
0.2 付近	暗い緑の弱いスポット
0.25 付近	暗い赤みの紫の強いスポット(ゲニボシド酸に相当)
0.35 付近	あざやかな青の弱いスポット
0.4 ~ 0.45 付近	くすんだ緑みの青の弱いテーリングしたスポット
0.45 付近	こい黄緑の強いスポット(アクテオシドに相当)
0.5 付近	こい青の強いスポット(ブランタゴグアニジン酸に相当)
0.95 付近	暗い灰みの青緑の強いスポット
0.97 付近	暗い灰みの青緑のスポット



分担研究課題 生薬中の不純物に関する研究

分担研究者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所 生薬部主任研究官

生薬中の水銀、ヒ素、鉛及びカドミウムの実態調査

研究要旨 これまでに、市場に流通する生薬中のヒ素及び重金属の含量を、ICP-MS装置または水銀測定装置及び原子吸光光度計により測定を行い、それらの実態を把握することを行ってきたが、これらのうち、いくつかの生薬において各測定法間で測定値に違いが認められた。今回、これらの生薬につき再試験を行い、その違いの原因説明を行うこととした。その結果、試験試料を均質にし、それぞれの測定法で求めた分析値は良く一致し、測定方法に依存せず、室間再現精度は良好なものであった。一方、同一ロット試料であっても、刻み生薬を分割して測定した個々の値について、かなりのバラツキが見られた。従って、すでに行われた試験生薬の金属量が違っていた原因は、使用した生薬検体間の含量の違いによるものと推察された。

協力研究者

塩田寛子：東京都健康安全研究センター 医薬品  
部医薬品研究科

これらは、同一の生薬につき ICP-MS 装置または水銀測定装置及び原子吸光光度計により測定を行ったものであるが、これらのうち、いくつかの生薬において各測定法間で測定値に違いが認められた。今回、これらの生薬につき再試験を行い、その違いの原因説明を行うこととした。

A. 研究目的

代替医療への関心が世界的に高まるに従い、生薬を使用する国が増え、それに伴い、生薬の品質確保が重要な課題となってきた。生薬の安全性と品質を評価し、生薬中の不純物の基準と分析法に関する WHO ガイドライン<sup>1)</sup>が作成されるなど、その取組みは世界的規模で展開されている。また、諸外国では、個別の金属について ppm レベルの限度値を設定されつつある<sup>2, 3)</sup>。本研究において、市場に流通する生薬のなかで、土壌重金属の影響を受けやすいと思われる根類及び根茎類生薬及び、漢方処方における構成生薬としての汎用性の高さ、諸外国での分析結果等を考慮し、選択した 20 種の生薬中のヒ素及び重金属の含量を測定し、それらの実態を把握することを行ってきた。

B. 研究方法

すでにヒ素及び重金属の含量測定を行い、測定値が異なった生薬のうち、ボウフウ 2 試料についてはヒ素を、ボタンビ 2 試料については水銀、ヒ素、鉛及びカドミウムを、シャクヤク 2 試料についてはカドミウムを、ウコン 1 試料については鉛を、ガジュツ 1 試料については鉛及びカドミウムを、それぞれの分析法で測定することとした。恒温室で保管されていた試料を粉末とし、これを 2 分し、それぞれを各測定法に用いた。また、新たに購入したボタンビ及びガジュツ（各 500 g x 2、同一ロット）（刻み生薬）につき、各 500 g を 10

等分し、それぞれの測定法で分析を行い、測定値のバラツキ等を検討した。

#### ICP-MS 装置による測定

##### 試薬・試液

硝酸は、原子吸光分析用（関東化学製）を、水は RO 水を更に Milli-Q（日本ミリポア製）により精製して得られた超純水を用いた。金属標準液は、和光純薬製を適宜希釈して用いた。その他の試薬は全て試薬特級品を用いた。

##### 試料調製

粉砕試料 0.1 g をポリテトラフルオロエチレン製分解容器に入れ、これに硝酸 1 mL を加えた後、密封し、150℃で 5 時間加熱した。冷後、水を加えて正確に 50 mL とし、検液とした。別に対象金属標準液を混合し、数濃度に希釈し標準液とした。これらを ICP-MS 装置に導入し、標準溶液から作成した検量線により、定量を行った。これらの試験に用いた器具類は、ポリプロピレン製のものを使用した

#### ICP-MS 測定条件

装置: Agilent 7500c (Agilent 社製)

高周波出力: 1.5 kW

プラズマガス流量: Ar 14.9 L/min

補助ガス流量: Ar 0.9 L/min

キャリアーガス流量: Ar 1.2 L/min

サンプリング位置: 8 mm

ペリスタポンプ回転速度: 0.1 rps

測定数: 3 points/peak

積分時間: 0.3 sec/point

#### 水銀測定装置及び原子吸光光度計による測定

水銀分析用添加剤として、活性アルミナ（添加剤 B、日本インスツルメンツ社製）及び炭酸ナト

リウムと水酸化カルシウムの等量混合物（添加剤 M、日本インスツルメンツ社製）を予め 700 °C で 3 時間以上加熱処理し用いた。硝酸マグネシウム 6 水和物、ヨウ化カリウム及びエタノールは特級品を、その他の試薬及び溶媒は有害金属測定用を用いた。

金属標準品として、ヒ素は日局第 15 改正（日局 15）ヒ素試験法に準じて調製した標準液を、他は各元素標準溶液（関東化学及び和光純薬工業製）1000 mg/L を適宜希釈して用いた。希釈溶媒として、水銀は 0.001 % L-システイン溶液、鉛、カドミウム及びヒ素は 0.5 mol/L 塩酸を用いた。

#### 試料検液及び標準検液の調製

- 1) 水銀: 粉末 0.1 g を正確に秤取し、そのまま用いた。水銀標準液 (0.1 ppm) を正確に 100  $\mu$ L 取り、試料と同様に操作した。
- 2) ヒ素: 粉末 0.4 g を正確に秤取し、日局 15 ヒ素試験法・検液の調製法・第 4 法に準じて灰化した。冷後、残留物に塩酸 3 mL を加え、水浴上で加温して溶かし、水を加えて正確に 50 mL とし、試験水溶液とした。試験水溶液 25 mL を正確にとり、20 % 塩酸 10 mL 及び 20 % ヨウ化カリウム溶液 5 mL を加え、0.5 mol/L 塩酸にて正確に 50 mL としたものを試料検液とした。ヒ素標準液 (0.1 ppm) を正確に、0 mL、0.5 mL、1 mL、2 mL 及び 3 mL とり、以下試験水溶液と同様に操作し、標準検液とした。
- 3) 鉛及びカドミウム: 粉末 3 g を正確に秤取し、JP 15 重金属試験法第 3 法に準じて灰化 (520 °C) した。冷後、王水 1 mL を加え、水浴上で蒸発乾固し、残留物を塩酸 3 滴で潤し、熱湯 10 mL を加えて 2 分間加温した。冷後、水を加えて正確に 25 mL とし、試験水溶液とした。試験水溶液 15 mL を正確にとり、25 % クエン酸水素二アンモニウム溶液 7.5 mL を加えた後、BTB 指示薬、

アンモニア水 (28 %) 及び塩酸を用いて中和した。更に 5 %ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液 4 mL を加え 15 分放置後、含水メチルイソブチルケトン (MIBK) 15 mL を加え、振とう放置し得られた MIBK 層を試料検液とした。鉛及びカドミウム混合標準液 (各 1 ppm) を正確に 0 mL, 1.5 mL, 3 mL, 6 mL 及び 15 mL とり、0.5 mol/L 塩酸を加えて 15 mL とし、以下試験水溶液と同様に操作し標準検液とした。

#### 分析条件

##### 1) 水銀 (加熱酸化-金アマルガム法)

装置: マーキュリー SP-3D 水銀測定装置 (日本インスツルメンツ社製)

加熱酸化条件: Low Mode, 一段階目 350 °C 4 分,  
二段階目 700 °C 6 分。

##### 2) ヒ素

装置: HFS-3 型水素化物発生装置 (日立製作所製)  
付日立偏光ゼーマン Z-5000 型フレイム原子吸光度計 (日立製作所製)

測定波長; 193.7 nm

スリット; 1.3 nm

燃料ガス (アセチレン); 2.0 L/min

助燃ガス (空気); 15.0 L/min

計算方法; 積分, 時定数; 1.0 秒。

##### 3) 鉛及びカドミウム

装置: 日立偏光ゼーマン Z-5000 型フレイム原子吸光度計 (日立製作所製)

測定波長; 鉛 283.3 nm, カドミウム 228.8 nm

以下ヒ素の分析条件と同じ。

#### C. 結果と考察

表 1 に生薬中の各生薬の測定結果を示した。測定法により検出限界や検出感度が異なるため、n. d. や Tr となった試料もあるが、それぞれの測定法で概ね一致した値が得られ、一旦粉末化して

均一化した試料では、分析法の定量限界以上の濃度であれば分析法によらず、一定の分析値が得られることが確認された。

次に、ボタンビ及びガジュツについて、同一ロットの生薬を分割し、それぞれ 10 回灰化を行い、ICP-MS と原子吸光で金属含量について測定した。ICP-MS 装置での一斉分析結果を表 2 に、原子吸光光度計によるカドミウム量の結果を表 3 に示す。

両手法で分析したカドミウム量について比較すると、ガジュツでは、ICP-MS で平均含量が  $0.38 \pm 0.07$  ppm であったにもかかわらず、原子吸光では  $0.26 \pm 0.02$  ppm と ICP-MS の方が約 1.4 倍平均値が大きいことが判明した。一方で、ボタンビでは、ICP-MS で  $0.38 \pm 0.04$  ppm, 原子吸光で  $0.39 \pm 0.03$  ppm とほぼ一致した。分析データのばらつきを見ると、ICP-MS の方が両生薬とも大きく、原子吸光の方が小さいことが判る。ICP-MS の場合実際に灰化に使用する検体量は 100mg であるが、原子吸光では 3g の試料を使用している。従って、この採取量の違いが、得られたデータの違いに反映されている可能性がある。

また、ICP-MS のデータを見ると、No. 5, 8, 9 の試料は、おしなべて重金属含量、ヒ素含量が高いことが判る。さらに、今回測定した金属のうち、特にガジュツのクロムでは、最大値と最小値で、約 4 倍の違いがあり、RSD も 36.3% と高い値を示した。

通常、刻み生薬の場合、同一ロットであっても、試料は複数個体による。さらに、同一個体であっても、金属量の分布は不均質である可能性が高い。今回得られた結果は、採取個体ひとつひとつで、重金属、ヒ素含量にかなりの違いが出ることを示すものである。

従って、すでに行われた試験生薬の金属含量が大きくばらついた原因は、試料の分析法によるのではなく、分析を行ったそれぞれの試料の含量に

よるものであることが推定された。さらに、特に生薬において、重金属、不純物含量を測定する際には、試料の採取量を含めたサンプリング手法と、得られた試料の均一化が重要であることが考えられた。

#### E. 結論

試験試料を均質にし、それぞれの測定法で求めた値は、良く一致し、測定方法に依存せず、室間再現精度は良好なものであった。一方、同一ロット試料であっても、分割して測定した個々の値について、かなりのバラツキが見られた。従って、すでに行われた試験生薬の金属量が違っていた原因は、使用した生薬検体間の含量の違いによるものと推察された。

#### 参考文献

1) WHO guidelines for assessing quality of

herbal medicines with reference to contaminants and residues, Geneva, WHO press, 2007

- 2) Hong Kong Chinese Materia Medica Standards Volume1, p129-131, Hong Kong, Department of Health, 2005
- 3) 生薬の残留農薬許容基準及び試験方法改訂(案) (2005.01.03), 食品安全情報 No. 2 / 2005, (2005.01.19), 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部, 参考: KFDA (<http://www.kfda.go.kr/>).

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ICP-MS 装置または水銀測定装置及び原子吸光光度計による測定結果

a) ICP-MS 装置による測定結果 (ppm, n=2)

生薬名	Hg	As	Pb	Cd
ボウフウ-A	-	0.28	-	-
ボウフウ-B	-	0.42	-	-
ボタンピ-A	n.d.	0.33	1.16	0.73
ボタンピ-B	n.d.	0.34	1.12	0.49
シャクヤク-A	-	-	-	0.28
シャクヤク-B	-	-	-	0.34
ウコン	-	-	0.72	-
ガジュツ	-	-	1.34	1.56

n.d.: not detected

b) 水銀測定装置及び原子吸光光度計による測定結果 (ppm)

生薬名	Hg	As	Pb	Cd
ボウフウ-A	-	Tr	-	-
ボウフウ-B	-	Tr	-	-
ボタンピ-A	0.006	Tr	0.9	0.61
ボタンピ-B	Tr	Tr	Tr	0.28
シャクヤク-A	-	-	-	0.25
シャクヤク-B	-	-	-	0.3
ウコン	-	-	Tr	-
ガジュツ	-	-	1.1	1.51

limit of detection: Hg, < 0.003 ppm; As, < 0.13 ppm; Pb, < 0.4 ppm; Cd, < 0.09 ppm

Tr: Hg, < 0.005 ppm; As, < 0.35 ppm; Pb, < 0.8 ppm; Cd, < 0.17 ppm

表2 ICP-MS 装置によるガジュツ及びボタンピ中のヒ素及び重金属量

ガジュツ							(ppm)
No.	As	Cd	Hg	Pb	Cr	Cu	
1	0.12	0.33	n.d.	1.10	1.79	7.76	
2	0.14	0.37	n.d.	1.21	2.19	8.05	
3	0.13	0.28	n.d.	1.39	1.22	7.08	
4	0.16	0.35	n.d.	1.24	1.43	8.21	
5	0.19	0.50	n.d.	1.56	2.01	10.97	
6	0.12	0.30	n.d.	1.51	0.74	6.64	
7	0.11	0.39	n.d.	1.49	0.58	6.00	
8	0.18	0.45	n.d.	1.44	1.43	11.48	
9	0.19	0.45	n.d.	1.59	1.37	10.20	
10	0.17	0.39	n.d.	1.08	1.24	9.46	
max/min	0.19/0.11	0.50/0.28	-	1.59/1.08	2.19/0.58	11.48/6.00	
mean	0.15	0.38	-	1.36	1.40	8.58	
S.D.	0.03	0.07	-	0.19	0.51	1.86	
R.S.D (%)	21.4	18.4	-	13.7	36.3	21.7	

ボタンピ							(ppm)
No.	As	Cd	Hg	Pb	Cr	Cu	
1	0.19	0.36	n.d.	0.99	5.36	3.79	
2	0.18	0.34	n.d.	0.79	2.14	3.78	
3	0.20	0.37	n.d.	0.79	2.38	3.49	
4	0.24	0.40	n.d.	0.72	4.77	5.05	
5	0.23	0.37	n.d.	0.97	2.58	4.60	
6	0.20	0.38	n.d.	0.84	3.40	3.87	
7	0.25	0.41	n.d.	0.92	3.99	5.45	
8	0.25	0.40	n.d.	0.79	4.01	5.21	
9	0.26	0.46	n.d.	0.83	4.17	5.71	
10	0.29	0.33	n.d.	0.69	4.30	6.43	
max/min	0.29/0.18	0.46/0.33	-	0.99/0.72	5.36/2.14	6.43/3.49	
mean	0.23	0.38	-	0.83	3.71	4.73	
S.D.	0.03	0.04	-	0.10	1.06	0.99	
R.S.D (%)	15.2	10.1	-	11.8	28.7	20.9	

表3 原子吸光光度計によるガジュツ及びボタンビ<sup>o</sup>中のカドミウム量

(ppm)		
No.	ガジュツ	ボタンビ <sup>o</sup>
1	0.26	0.39
2	0.25	0.37
3	0.24	0.37
4	0.29	0.36
5	0.25	0.40
6	0.25	0.38
7	0.27	0.37
8	0.28	0.38
9	0.26	0.38
10	0.24	0.46
max/min	0.29/0.24	0.46/0.36
mean	0.26	0.39
S.D.	0.02	0.03
R.S.D.(%)	6.80	7.63

Tr: <0.17 ppm

分担研究報告書

分担研究課題 生薬中の不純物に関する研究

分担研究者 鎌倉浩之 国立医薬品食品衛生研究所生薬部 主任研究官

漢方処方煎液への農薬の移行並びに漢方処方煎液の乾燥工程における農薬の消長  
研究協力者 佐藤正幸（北海道立衛生研究所食品薬品部薬用資源科研究主査）

我々は生薬の安全性確保を目的として、生薬中の不純物のひとつである残留農薬について実証的検討を行っている。生薬の85～90%は漢方処方エキスの形で流通している。通例、漢方処方は水のみを加え煎じて利用され、エキス製剤においても抽出溶媒に水が用いられる。昨年度、我々は漢方処方煎液への農薬の移行について明らかにするため、有機リン系農薬が検出された生薬を用い、補中益気湯及び半夏厚朴湯を調製し、煎液への有機リン系農薬の移行について検討した。その結果、補中益気湯において、キナルホス、フェントロチオン、メチダチオン、パラチオンメチル、マラチオン及びフェントエートで最大31%、半夏厚朴湯においてはパラチオン及びパラチオンメチルで19%及び28%しか移行しないことが判明した。漢方処方が異なる場合、煎液への農薬の移行率が異なることが考えられることから、今年度はエキスが日局十五に記載されている加味逍遙散について検討した。その結果、煎液からパラチオンが23%未満、フェントロチオンが最大9%及びフェントエートが10%検出され、クロルピリホスは検出されなかった。

漢方処方エキスは水で煎じた後、遠心分離などにより固液分離し、得られた浸出液を減圧濃縮後、濃縮液を凍結乾燥法や噴霧乾燥（スプレードライ）法などにより蒸発乾燥して製せられることが多い。遠心分離の際、沈殿物中の農薬は除去されること、蒸発乾燥する際、農薬が一部除去される可能性もあることから、最終エキスにおける農薬含量は更に低くなるものと思われる。そこで今回、有機リン系農薬が移行した上記半夏厚朴湯の乾燥工程における農薬の消長についても検討した。その結果、遠心操作により煎液中の農薬は一部除去されること、農薬含量は凍結乾燥エキスよりもスプレードライエキスの方が異性化、分解、揮散などの影響により低値を示すこと、煎液に農薬が移行したとしても、凍結乾燥及びスプレードライエキス中の農薬含量は煎液から検出された量のそれぞれ50%以下及び10%以下になることが明らかとなった。

従って、生薬からパラチオン及びパラチオンメチルが検出されたとしても、最終エキスにおける農薬含量は最大でも凍結乾燥した場合、生薬から検出された量のそれぞれ10%及び14%、スプレードライした場合、2%及び3%程度とかなり低くなることが判明した。他の漢方処方エキスにおいても同様に低値を示すことが考えられることから、今後生薬及び漢方処方エキス中の残留農薬基準を設定する際には、これらの点を考慮する必要がある。



研究協力者

佐藤正幸 北海道立衛生研究所食品薬品部  
薬用資源科研究主査

袴塚高志 国立医薬品食品衛生研究所  
生薬部室長

姉帯正樹 北海道立衛生研究所食品薬品部  
薬用資源科長

#### A. 研究目的

我々は生薬の安全性確保を目的として、生薬中の不純物のひとつである残留農薬について実証的検討を行っている<sup>1-3)</sup>。生薬の85~90%は漢方処方エキス<sup>4)</sup>の形で流通している。通例、漢方処方は水のみを加え煎じて利用され、エキス製剤においても抽出溶媒に水が用いられる。農薬の多くは脂溶性であり、水への移行率は低いと考えられるが、漢方処方煎液への農薬の移行に関しては未だ不明な点が多い。

昨年度、我々は漢方処方煎液への農薬の移行について明らかにするため、有機リン系農薬が検出された生薬を用い、エキスが日局十五に収載されている補中益気湯<sup>4)</sup>及び収載が検討されている半夏厚朴湯<sup>5)</sup>を調製し、煎液への有機リン系農薬の移行について検討した。その結果、補中益気湯において、キナルホス、フェントロチオン (MEP)、メチダチオン (DMTP)、パラチオンメチル、マラチオン及びフェントエート (PAP) で最大 31%、半夏厚朴湯においてはパラチオン及びパラチオンメチルで 19%及び 28%しか移行しないことが判明した<sup>6)</sup>。

漢方処方が異なる場合、煎液への農薬の移行率が異なることが考えられる。そこで、今年度はこれまでに有機リン系農薬が検出されたトウキ<sup>6)</sup>、カンゾウ<sup>6)</sup>及びハッカ<sup>7)</sup>を用い、エキスが日局十五に収載されている加味逍遙散<sup>4)</sup>における有機リン系農薬の移行について検討した。

漢方処方エキスは水で煎じた後、遠心分離などにより固液分離し、得られた浸出液を減圧濃縮後、濃縮液を凍結乾燥法や噴霧乾燥 (スプレードラ

イ)法などにより蒸発乾燥して製せられることが多い<sup>8)</sup>。遠心分離の際、沈殿物中の農薬は除去されること、蒸発乾燥する際、農薬が一部除去される可能性もあることから、最終エキスにおける農薬含量は更に低くなるものと思われる。

そこで今回、漢方処方煎液の乾燥工程における農薬の消長についても検討するため、有機リン系農薬が移行した上記半夏厚朴湯を遠心分離後、凍結乾燥法又はスプレードライ法による蒸発乾燥を行い、得られた遠心沈殿物及び乾燥エキス中の残留有機リン系農薬を分析した。

#### B. 研究方法

**試料:** 国内で入手した以下の 13 品目 19 検体を使用した。有機リン系農薬が検出された生薬を表 1 に示した。

加味逍遙散用: トウキ (大和当帰 No. 1, 2), ピヤクジュツ (No. 1), サイコ (No. 7), サンシン (No. 2), ショウキョウ (No. 1), シヤクヤク (No. 3), ブクリョウ (No. 2, 3), ボタンビ (0-A-11), カンゾウ (0-C-1, 0-B-1) 及びハッカ (No. 2, 4, 5)  
半夏厚朴湯用: ハング (No. 3), ブクリョウ (No. 3), コウボク (No. 2), ソヨウ (T-A-3, 0-C-3) 及びショウキョウ (No. 1)

**試薬:** 表 1 に示した 6 種類の有機リン系農薬標準品は和光純薬工業(株)製を用いた。アセトン、アセトニトリル及びn-ヘキサン (ヘキサン) は和光純薬工業(株)製残留農薬試験用を、メタノールは和光純薬工業(株)製特級品を用いた。塩化ナトリウム (特級)、無水硫酸ナトリウム (残留農薬試験用) は和光純薬工業(株)製を用いた。水は蒸留脱イオン水を用いた。Sep-Pak Vac tC<sub>18</sub> カートリッジ (5 g/20 cc, C18 ミニカラム), Sep-Pak Plus Silica カートリッジ (690 mg, シリカゲルミニカラム) 及び Sep-Pak Vac Diol カートリッジ (1 cc, ジオールミニカラム) は Waters 社製を用いた。

**農薬混合標準溶液:** それぞれの農薬標準品を 500 µg/mL の濃度となるようにアセトンに溶解後、アセトンで希釈し各 2 µg/mL の濃度に調製した。

## 試験溶液の調製

### 1) 生葉 (図 1)

既報<sup>7)</sup>に従い、ハッカ試験溶液を調製した。

試料 5.0 g に水 20 mL を加え、1 時間放置後、アセトニトリル 80 mL を加え、5 分間ホモジナイズ (株式会社日本精機製作所製 Ace HOMOGENIZER, 5,000 rpm) した。吸引ろ過後、ろ紙上の残留物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、上記と同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液の 4 分の 1 量をあらかじめアセトン 30 mL、水 20 mL で順次洗浄した C18 ミニカラム (再使用時には、アセトン 60 mL、水 20 mL で順次洗浄。ただし、4 回以内) に注入し、更にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を注入した。カラムから溶出した液を合わせ、40°C 以下で減圧濃縮しアセトニトリルを除去した。濃縮液を塩化ナトリウム 5 g を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう後、ヘキサン層を分取した。水層にヘキサン 50 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、水 50 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを約 2 mL に減圧濃縮後、窒素気流下で乾固し、抽出残渣をアセトン/ヘキサン (3:17) 5.0 mL に溶解したものを試料溶液とした。

あらかじめアセトン/ヘキサン (3:17) 10 mL で洗浄したシリカゲルミニカラムに、試料溶液 2.0 mL を注入後、アセトン/ヘキサン (3:17) 3 mL、10 mL を順次注入し、カラムから溶出した液を合わせた。溶出液を 40°C 以下で約 2 mL に減圧濃縮後、窒素気流下で乾固し、アセトン 2.0 mL に溶解し、試験溶液とした。

### 2) 漢方処方煎液及び煎出残渣 (図 2, 3)

表 2 に示した加味逍遙散 1 日量の生葉<sup>9)</sup>と水 500 mL を自動煎じ器 (株式会社ウチダ和漢薬製「煎治」、沸騰調節ツマミ「強」) に入れ、約 40 分間、約半量まで煎じつめた後、こした。煎出残渣を水 50 mL で洗浄し、洗浄液と煎液を合わせた。5 分間遠心 (TOMY LC-121, 3,000 rpm) した後、上清を吸引ろ過した。ろ紙上の残留物は遠心沈殿物と合わせ

分析に供した。

ろ液をあらかじめアセトン 30 mL、水 20 mL で順次洗浄した C18 ミニカラムに注入し、更にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を注入した。カラムから溶出した液を合わせ、40°C 以下で減圧濃縮しアセトニトリルを除去した。濃縮液を塩化ナトリウム 30 g を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう後、少量のメタノールを添加し、2 層に分離した。ヘキサン層を分取後、水層にヘキサン 50 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、水 50 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを約 2 mL に減圧濃縮後、ヘキサン 5.0 mL に溶解したものを試料溶液 A とした。

遠心沈殿物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、5 分間ホモジナイズ (5,000 rpm) 後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、上記と同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液をあらかじめアセトン 30 mL、水 20 mL で順次洗浄した C18 ミニカラムに注入し、更にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を注入した。カラムから溶出した液を合わせ、40°C 以下で減圧濃縮しアセトニトリルを除去した。濃縮液を塩化ナトリウム 5 g を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう後、ヘキサン層を分取した。分液漏斗中の不溶物をメタノール 3 mL に溶解後、水層にヘキサン 50 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、水 50 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを約 2 mL に減圧濃縮後、ヘキサン 5.0 mL に溶解したものを試料溶液 B とした。

シリカゲルミニカラムを後に連結したジオールミニカラム (ジオール-シリカゲルミニカラム、あらかじめ、各々ヘキサン 10 mL で洗浄) に、試料溶液 A 又は B 1.0 mL を注入した。ヘキサン 15 mL で洗浄後、ジオールミニカラムを取り外し、アセトン/ヘキサン (1:9) 20 mL を注入した。カラムから溶出した液を 40°C 以下で約 2 mL に減圧濃縮後、窒素気流下で乾固し、アセトン 1.0 mL に溶

解し、煎液上清又は遠心沈殿物の試験溶液とした(図2)。

煎出残渣にアセトニトリル 80 mL を加え、5 分間ホモジナイズ (5,000 rpm) した。吸引ろ過後、ろ紙上の残留物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、上記と同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液をあらかじめアセトン 30 mL、水 20 mL で順次洗浄した C18 ミニカラムに注入し、更にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を注入した。カラムから溶出した液を合わせ、40℃以下で減圧濃縮しアセトニトリルを除去した。濃縮液を塩化ナトリウム 5 g を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう後、ヘキサン層を分取した。分液漏斗中の不溶物をメタノール 3 mL に溶解後、水層にヘキサン 50 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、水 50 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを約 2 mL に減圧濃縮後、試験管ミキサーで激しく攪拌し、ヘキサン 5.0 mL に残渣を分散させたものを試料溶液 C とした。この液 1.0 mL にヘキサン 3.0 mL を加えて希釈したものを試料溶液 D とした。試料溶液 D 1.0 mL を試料溶液 A 及び B と同様に操作し、煎出残渣の試験溶液とした。

GC-FPD 分析において農薬の定量値が定量限界未満の場合には、試験溶液をマイクロ試験管に移し替え、窒素気流下で 2~5 倍に濃縮したものを定量用試験溶液とした。

### 3) 半夏厚朴湯遠心沈殿物及び乾燥エキス

有機リン系農薬が検出されたソヨウ (T-A-3 又は O-C-3) を含む表 2 に示した半夏厚朴湯 1 日量の生薬<sup>9)</sup>と水 500 mL を自動煎じ器に入れ、約 40 分間、約半量まで煎じつめた後、こした。煎出残渣を水 50 mL で洗浄し、洗浄液と煎液を合わせた。上記の煎出操作を再度繰り返した後、煎液を合わせ、水を加え 550 g とした。5 分間遠心 (3,500 rpm) した後、上清を綿栓ろ過した。

重量を測定した 500 mL のナス型フラスコにろ液の 1/5 量を採取し、-40℃のクールパス (エタノール) にて回転させながら凍結した後、直ちに

凍結乾燥機にセットした。ポンプで一晩吸引後、残った乾燥エキス量を算出した。乾燥エキスをスパーテルで掻き出した後、乳鉢で軽く粉末化し、バイアル瓶に移してから、回収凍結乾燥エキス量を算出した。

ろ液の 4/5 量をスプレードライヤーに導入後、回収瓶及びサイクロンに残った乾燥エキス量を算出した。乾燥エキスをスパーテル及び絵筆で掻き落とした後、バイアル瓶に移してから、回収スプレードライエクス量を算出した (図4)。

沈殿物に水を加え 25 mL とした後、振り混ぜ、半量を採取した。アセトニトリル 50 mL を加え、5 分間ホモジナイズ (5,000 rpm) 後、吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、上記と同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液をあらかじめアセトン 30 mL、水 20 mL で順次洗浄した C18 ミニカラムに注入し、更にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を注入した。カラムから溶出した液を合わせ、40℃以下で減圧濃縮しアセトニトリルを除去した。濃縮液を塩化ナトリウム 5 g を入れた分液漏斗に移し、ヘキサン 50 mL を加え、5 分間振とう後、ヘキサン層を分取した。水層にヘキサン 50 mL を加え、上記と同様の操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、水 50 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを約 2 mL に減圧濃縮後、ヘキサン 5.0 mL に溶解したものを試料溶液とした。試料溶液 1.0 mL を加味逍遙散の試料溶液と同様に操作し、遠心沈殿物の試験溶液とした (図5)。

乾燥エキス試料に水 10 mL を加え、1 時間放置後、アセトニトリル 40 mL を加え、5 分間ホモジナイズ (5,000 rpm) した。吸引ろ過後、ろ紙上の残留物にアセトニトリル/水 (4:1) 50 mL を加え、上記と同様に操作し、ろ液を合わせた。ろ液を沈殿物と同様に操作し、乾燥エキスの試験溶液とした (図6)。

### 装置及び分析条件

1) 炎光光度型検出器付ガスクロマトグラフ (GC-FPD)

装置：(株)島津製作所製 FPD 検出器付 GC-14A；カラム：J & W社製 DB-1 又は DB-1 MS (0.25 mm i. d. ×30 m, 膜厚 0.25 μm)；カラム温度：50°C (2 min) →10°C/min →260°C (5 min)；注入口温度：260°C；検出器温度：280°C；キャリアーガス（ヘリウム）：1.5 kg/cm<sup>2</sup>；メイクアップガス（ヘリウム）：0.8 kg/cm<sup>2</sup>；水素：1.2 kg/cm<sup>2</sup>；空気：0.7 kg/cm<sup>2</sup>；注入量：1 μL (スプリットレス)。

## 2) 凍結乾燥

凍結乾燥機：東京理化学器械(株)製 FREEZE DRYER FDU-830

凍結乾燥機ポンプ：アルバック機工(株)製 ULVAC GCD-135XA

## 3) スプレードライ

スプレードライヤー：東京理化学器械(株)製 スプレードライヤー SD-1000

スプレードライヤーコンプレッサー：日立工機(株)製 サイレントエアコンプレッサ SC820

入口温度：150°C；出口温度：85～90°C；乾燥空気量（熱風量）：0.68～0.70 m<sup>3</sup>/min；噴霧圧力：100 kPa；送液速度：ポンプ speed 目盛 3.2 (約 600 mL/h)

## 添加回収試験

あらかじめ農薬が検出されないことを確認した生薬を用いて加味逍遙散を調製し、煎液及び煎出残渣にそれぞれ農薬混合標準溶液 1.0 mL を添加後、直ちに抽出操作を開始した。試行数は無添加試料については 1 回、添加試料については 3 回とした。

## C. 研究結果

### 生薬中の残留農薬

前回の調査<sup>6)</sup>で有機リン系農薬が検出されたカンゾウ、ソヨウ、トウキ及びブクリョウについてはそのままの検出値を用い、ハッカについては、農薬残留量のバラツキを調べるため、既報<sup>7)</sup>に従い、再度分析を実施した。その結果、ハッカ 1 検体からパラチオン及びパラチオンメチルが 0.082 ppm (CV 17.6%) 及び痕跡量、別の 1 検体からク

ロルピリホスが 0.055 ppm (CV 32.0%) 検出された (表 1)。

## 添加回収試験

加味逍遙散における回収率は、煎液上清において 63～71% (CV 1.0～9.8%)、沈殿物において 24～29% (CV 3.6～17.9%)、上清と沈殿物を合わせた煎液において 87～99% (CV 1.2～1.8%)、煎出残渣において 80～87% (CV 4.7～11.9%) と良好な結果が得られた (表 3)。

## 漢方処方煎液への有機リン系農薬の移行

検出農薬の異なる生薬を用い、2 種類の加味逍遙散を調製し、煎液への有機リン系農薬の移行について検討した。煎液及び煎出残渣各々に存在する農薬量を煎出前の検出量と比較し、表 4 に示した。

上清と沈殿物を合わせた煎液からパラチオンが 23% 未満、フェニトロチオンが最大 9% 及びフェントエートが 10%、煎出残渣からそれぞれ 59% 未満、最大 32% 及び 79% 検出された。クロルピリホスについては煎液及び煎出残渣からは検出されなかった。

なお、今回生薬から痕跡量検出された農薬については、微量であるため対象から除外した。

## 半夏厚朴湯の乾燥工程における有機リン系農薬の消長

前回農薬が検出された 2 種類の半夏厚朴湯<sup>6)</sup>について、遠心沈殿物、凍結乾燥エキス及びスプレードライエキス中の残留有機リン系農薬を分析した。

各々から検出された農薬量（乾燥エキスについては上清全量換算値）を乾燥前の農薬量（パラチオン 92 ng、パラチオンメチル 1920 ng）と比較し、表 5 に示した。パラチオンは遠心沈殿物から 33 ng (CV 17.2%)、凍結乾燥エキスから 40 ng (CV 10.6%)、スプレードライエキスから 6.2 ng (CV 15.7%)、パラチオンメチルは遠心沈殿物から 310 ng (CV 10.5%)、凍結乾燥エキスから 831 ng (CV 7.9%)、スプレードライエキスから 165 ng (CV 11.4%) 検出された。