

酵素免疫測定法を利用した残留農薬分析法 (第2報)

江崎 好美¹・長 律子¹・藤本 喬²

Analytical Method of Residual Pesticides in Food by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Part 2)

Yoshimi ESAKI, Ritsuko CHO and Takashi FUJIMOTO

要 旨

カーバメート系農薬7種を対象とし、OHMICRON社製のRaPIDAssayカルバリル検出キットを用いて農作物中の残留農薬分析法の検討を行った。

1. 試料からの試験溶液の調製方法について

カルバリルを添加した農作物を用いて試験溶液の調製方法について検討した。その結果、試料を一度アセトンで抽出し溶媒留去後20%酢酸エチル/ヘキサン溶液に転溶し、さらにヘキサン/アセトニトリル分配を行うこととした(抽出法Ⅱ)。ヘキサン/アセトニトリル分配を行わなくても(抽出法Ⅰ)、カルバリルを5ppb添加したときの回収率は90~105%と良好であったが、40ppb添加したときの回収率は一部の農作物で50%を下回り、80%以上の回収率を確保するにはヘキサン/アセトニトリル分配を行う必要があった。

2. 検出下限について

検出下限は、試料換算すると感度のよいカルバリルで0.004ppm、感度の悪いピリミカルブで2ppmであった。

3. カルバリル以外の対象農薬における添加回収実験

カルバリル以外の6農薬について、それぞれ直線性のある濃度範囲内で、低濃度と高濃度の2段階で添加回収実験を行ったところ、クロルプロファム1ppm添加とメチオカルブ0.1ppm添加で回収率が悪く20%以下であったが、それ以外はいずれの農薬においても回収率は良好で、76~127%であった。

この方法で対象農薬を測定した場合、現在各農薬毎に設定されているそれぞれの農作物における残留農薬基準値のうち最も低い基準値を確認できたものは、カルバリル、メチオカルブ、イソプロカルブ、クロルプロファム、フェノプロカルブの5農薬であった。なかでもカルバリル、メチオカルブ、イソプロカルブの3農薬はその基準値の $\frac{1}{5}$ を充分確認できた。

Key Words : 酵素免疫測定法 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

市販キット Commercial Kits, カーバメート系農薬 Carbamate Pesticides

交差性 cross-reactivity, 抗体 antibody

I は じ め に

近年、残留農薬分析法の一つの手法として、酵素免疫測定法(ELISA法)が検討されている¹⁾⁻⁶⁾。その多くは、ELISA法の特異性を利用した単一成分分析法がほとんどである。

著者らは、類似物質にも交差性を示すという性質に着目し、数種類の農薬を同時に確認する検査法としてELISA法の活用を試みた。第1報⁷⁾で、3種類の市販キットについて交差性(抗体との結合性)を調べ、そのうちのひとつであるOHMICRON社製のカルバリル検出キットが、カルバリルを含めた8種類の農薬に対して交差性を示すことを報告した。また、試験溶液の調製方法としては、試料をアセトンで抽出し溶媒留去後、蒸留水で希釈しただけでは、試料中のマトリックスの影響を

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

2. 福岡市教育委員会学校給食センター

軽減することは難しく、クリーンアップが必要であった。

そこで、今回、第2報としてカルバリル検出キットに交差性を示した農薬のうち7農薬を対象農薬とし、農作物からの試験溶液の調製方法を中心に検討したので、以下報告する。

II 実験方法

1. 試料

いちご、キャベツ、きゅうり、白米、すもも、大根、梨、白菜、ばれいしょ、ほうれん草、みかん、桃、りんごの計13件

2. 試薬

1) 対象農薬

カルバリル、メチオカルブ、イソプロカルブ、クロルプロファム、ベンダイオカルブ、フェノブカルブ、ピリミカルブの7種類

2) 農薬標準液：対象農薬の200 ppmメタノール溶液を作成し、それを蒸留水で適宜希釈して用いた。

3) その他の試薬は全て残留農薬分析用を用いた。

3. 市販キット

カルバリル検出キット (OHMICRON社, USA)

磁性体コーティング抗体溶液、酵素標識抗原、発色剤水溶液、反応停止液、チューブ、希釈液

4. 使用機器

1) 磁石ユニット：60チューブ用 (OHMICRON社製)

2) 吸光光度計：ハンディーフォトメーター Model-6 (SCETI社製)

3) ボルテックスミキサー：ModelTME-21 (ADVANTEC製)

5. 測定方法

1) 抗原抗体反応

チューブに試験溶液あるいは農薬標準液をそれぞれ200 μ lずつ分注し、酵素標識抗原250 μ l、磁性体コーティング抗体溶液500 μ lを加え、ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で30分間インキュベートした。

2) 洗浄操作

磁石ユニットにチューブを装着し、5分間放置することで抗体の分離を行った。磁石ユニットにチューブをとりつけたまま、溶液を静かに捨てた。蒸留水0.9 mlを各チューブに静かに加え、磁石ユニット上で2分間放置後、磁石ユニットにチューブをとりつけたまま、溶液を静かに捨て洗浄した。この洗浄操作を再度繰り返した。

3) 発色操作及び測定方法

チューブを磁石ユニットから取り外し、発色剤水溶液500 μ lを加えた。これを、ボルテックスミキサーで攪拌後、室温で20分間インキュベートした後、反応停止液500 μ lを加え、450 nmで吸光度を測定した。

4) 結果の評価方法

吸光度について、第1報⁷⁾に示した方法に従って評価した。すなわち、次式により B/B_0 (%)に換算し、標準液の B/B_0 とそれぞれの濃度を片対数グラフに表し、検量線を作成した。

$$B/B_0 (\%) = (\text{標準液又は試料の} A_{450} / \text{ブランクの} A_{450}) \times 100$$

6. 試料からの試験溶液の調製方法

1) 抽出法 I

試料20 gにアセトンを100 ml加えて混和した後、ろ過した。残渣をアセトン50 mlで洗浄し、ろ液をあわせた後、ロータリーエバポレーターで30 mlまで濃縮した。これに10%食塩水100 mlと20%酢酸エチル/ヘキサン100 mlを加え混和後、上層を分取した。下層には再度20%酢酸エチル/ヘキサン50 mlを加え混和後、上層をあわせ無水硫酸ナトリウムで脱水し抽出液Iとした。

2) 抽出法 II

抽出法Iを行って得られた抽出液を濃縮乾固後、ヘキサン30 mlで溶解し、さらにヘキサン飽和アセトニトリル30 mlを加えて混和した。液が分離するまで静置した後、下層を分取し抽出液IIとした。

3) 試験溶液の調製

それぞれの抽出液I及びIIを濃縮乾固後、ヘキサン2 mlで溶解し、蒸留水2 mlを加え、エバポレーターで溶媒を完全に留去した後、10分間超音波処理した。これを蒸留水で10 mlに定容し、メンブランフィルターを用いて固形物を取り除いた。この溶液を蒸留水でさらに10倍希釈後、キット付属の希釈液と等量混合し、試験溶液I及びIIを調製した。この試験溶液1 mlは、試料0.1 gに相当する。なお、ブランクには蒸留水0.5 mlにキット付属の希釈液0.5 mlを加えた溶液を用いた。

III 結果及び考察

1. 測定方法について

第1報⁷⁾で確認した直線性を示す濃度範囲内で、対象農薬7種の検量線を作成した(図1)。標準偏差及び変動係数については、最も感度のよいカルバリル、中程度の感度であるクロルプロファム、感度の悪いフェノブカルブとピリミカルブの4農薬を選び、それぞれ10回の繰り返し測定を行って求めた(表1)。

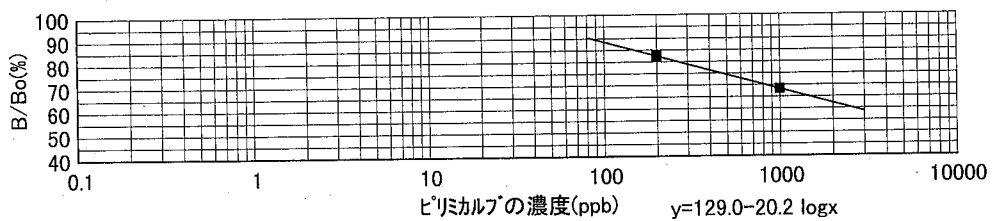
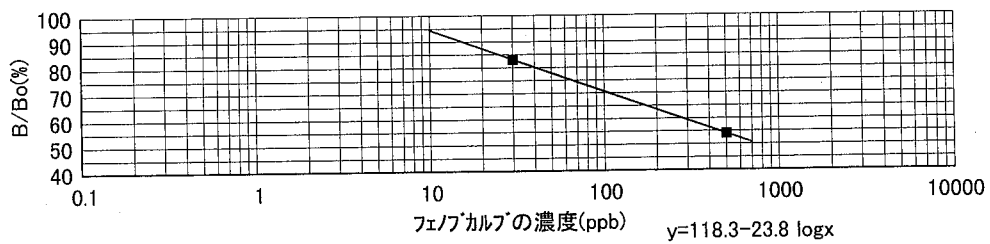
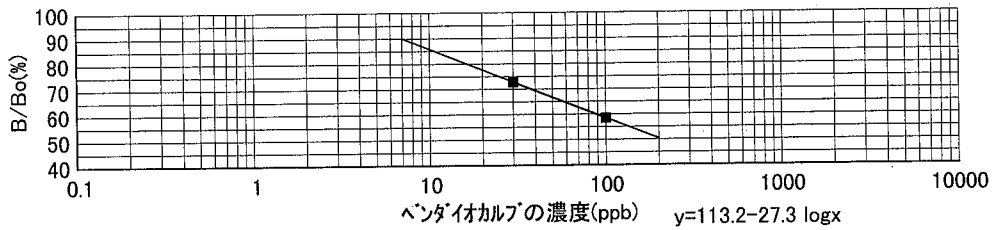
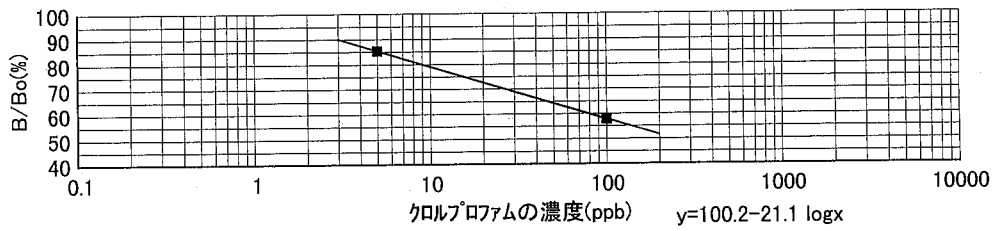
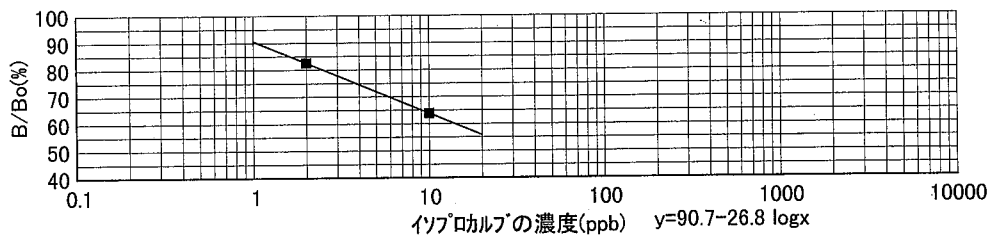
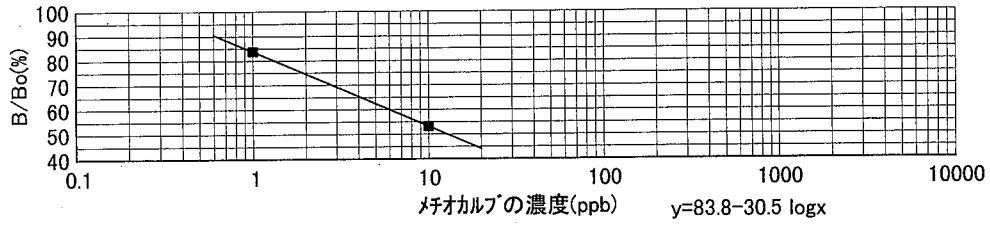
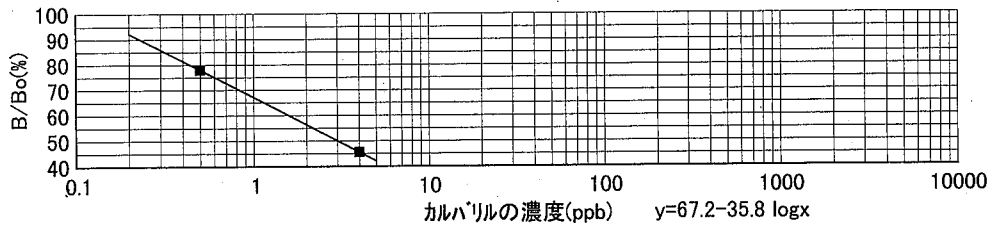


図1 対象農薬の検量線

表1 4農薬の標準液を用いた時の標準偏差と変動係数
(測定回数 n=10)

農薬名	濃度 (ppb)	B/B ₀ 値の平均 ±標準偏差(%)	変動係数 (%)
カルバリル	0.5	78.0±4.1	5.3
	4	45.7±3.8	8.3
クロルプロファム	5	85.4±4.5	5.2
	100	57.9±4.6	7.9
フェノブカルブ	30	83.1±4.4	5.3
	500	54.0±2.7	5.0
ピリミカルブ	200	82.5±6.0	7.3
	1000	68.4±7.0	10.3

その結果、カルバリルが最も感度がよく、検量線の傾きも大きかった。これは、使用したキットがカルバリル検出用であるため、最もよい状態で抗体と結合するものと考えられた。しかし感度がよければ傾きも大きくなるというわけではなく、クロルプロファムのようにピリミカルブの約40倍の感度を持つにも関わらず、傾きはピリミカルブとほとんど変わらないものもあった。

また表1に示すように、4農薬を10回繰り返し測定した時の標準偏差は2.7~7.0%、変動係数は5.0~10.3%であり、ピリミカルブで若干ばらつきがみられた。

2. 試料からの試験溶液の調製方法について

第1報⁷⁾で、試料をアセトン抽出し溶媒留去後、蒸留水で希釈しただけでは、試料中のマトリックスの影響を軽減することは難しく、クリーンアップ操作の必要性を報告した。しかし、簡便な測定法といわれているELISA法を複数の農薬の検査法として活用する場合、クリーンアップ操作はできるだけ簡単であることが要求される。

そこで、カルバリルを用いて、クリーンアップ操作がどこまで必要か試験溶液の調製方法について検討を行った。

1) 抽出法Iについて

抽出法Iでは、一度アセトン抽出し溶媒留去したものを再度別の溶媒に転溶してみた。転溶に用いる溶媒を決定するにあたっては、次のことを考慮した。

- ① ジクロロメタン、クロロホルム等の有害性の高い溶媒を使用しないこと。
- ② 対象農薬が抽出されやすいこと。

そこで、今回対象とした7農薬についていずれも90%以上の抽出率を示すことが報告されている⁸⁾20%酢酸エチル/ヘキサンを用いることとした。

まず、抽出法Iを行った場合の測定に及ぼすマトリックスの影響を確認するために、カルバリルを各農作物の抽出液に添加し回収率を求めた。試料へのカルバリル標準液の添加は、メンブランフィルターに通した溶液を10倍希釈する段階で行った。またその添加量は、試験溶液1ml中に0.5ng及び4ng含まれるように(試料換算して5ppb, 40ppbに相当)調整した。その結果を表2に示す。

表2 抽出法Iによる13農作物の測定時のマトリックスの影響
(単位: %)

試料の種類	無添加 B/B ₀	カルバリル添加			
		0.5 ng/1 ml		4 ng/1 ml	
		B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率
いちご	99.7	79.1	93	43.9	112
キャベツ	94.0	76.5	110	47.4	90
きゅうり	96.4	78.5	96	46.2	97
白米	97.3	75.8	115	46.3	96
すもも	92.2	77.9	100	46.0	98
大根	92.8	76.6	109	46.3	96
梨	97.5	79.6	90	42.7	121
白菜	94.4	77.0	106	43.7	114
ばれいしょ	93.4	76.0	113	46.8	93
ほうれん草	97.6	77.2	105	46.6	94
みかん	94.5	76.4	110	46.5	95
桃	95.8	75.8	115	47.1	91
りんご	94.5	76.0	113	46.6	94
平均	95.4	77.1	106	45.8	99
±標準偏差	±2.2	±1.3	±9	±1.4	±10

第1報⁷⁾で報告したようにアセトン抽出し溶媒留去した溶液を希釈するだけでは、試料中のマトリックスが原因となり見かけ上回収率が400%を超えるものもあった。しかし、20%酢酸エチル/ヘキサン転溶操作を加えたことで、カルバリルの回収率は0.5ng/1ml添加で106±9%、4ng/1ml添加で99±10%と良好であった。またカルバリル無添加のB/B₀値は、農作物の種類に関わらず90%以上であった。以上のことから、測定上試料中のマトリックスの影響はないと思われた。

そこで次に、6種類の農作物を試料とし、試料換算して5ppb及び40ppbになるよう試料にカルバリルを添加し、抽出法Iで試験溶液を調製したときの添加回収実験を行った。その結果を表3に示す。

表3に示したように、5ppb相当添加したときの回収率は100±10%と良好であったが、40ppb相当添加したときの回収率は悪く、特にほうれん草やみかんでは

表3 抽出法Ⅰによる6農作物の添加回収実験
(単位：%)

試料の種類	無添加	カルバリル添加			
		5 ppb相当		40ppb相当	
	B/B ₀	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率
いちご	99.7	75.4	118	49.4	79
きゅうり	96.4	79.0	93	56.2	51
梨	97.5	77.4	102	53.8	59
ばれいしょ	93.4	77.7	102	53.2	62
ほうれん草	97.6	78.4	97	57.2	48
みかん	94.5	79.7	89	59.2	42
平均	96.5	77.9	100	54.8	57
±標準偏差	±2.3	±1.5	±10	±3.5	±13

50%以下であった。

前述したように、ELISA法での測定上の妨害はなかったことから、40 ppb相当添加で回収率が低下した原因は、溶媒を留去し水に溶解する段階で生成した固形物の中に、一部カルバリルが取り込まれたためではないかと思われた。

溶媒を留去し水に溶解する際、カルバリルの溶解性を高めるために、以下に示す3つの方法を比較してみた。

- ① 水と溶媒の共存する状態でエバポレーターを用いて溶媒留去し、超音波処理した。
- ② エバポレーターで溶媒留去後、水を加えて超音波処理した。
- ③ 水と溶媒の共存する状態でエアレーションにより溶媒留去後、超音波処理した。

その結果、②及び③の方法よりも①の方法のほうが再現性がよく回収率も1割程よかったが、著しく改善されることはなかった。

また、溶媒を留去し水に溶解する際に生じる固形物をあらかじめメタノールで溶解する方法を試みた。このときのメタノールは、第1報⁷⁾で測定に影響しないことを確認した濃度範囲内で使用した。しかし、吸光度がばらつき再現性を得ることが出来なかった。これは、メタノールを使用することで、試験溶液中に溶け込んだ水に不溶かつメタノールに可溶性物質が、測定妨害となったものと思われた。

そこで、水に不溶性固形物の量を減らしカルバリルの水への溶解性を高めるために、ヘキサン/アセトニトリル分配を行う抽出法Ⅱを試みた。

2) 抽出法Ⅱについて

抽出法Ⅱで試験溶液を調製し、再度試料への添加回収実験を行った。その結果を表4に示した。抽出法Ⅱは、抽出法Ⅰにヘキサン/アセトニトリル分配を加えた方法

である。用いた試料及びカルバリルの添加量は、抽出法Ⅰで行った添加回収実験のときと同じである。

表4に示したように、ヘキサン/アセトニトリル分配を行ったことで、40 ppb相当添加したときの回収率は、82~90%に向上した。なかでも抽出法Ⅰで回収率が50%に満たなかったほうれん草やみかんでは、約2倍の回収率を示した。また、カルバリル無添加のB/B₀値は農作物の種類に関わらず90%以上であった。

以上の検討により、7農薬を同時にELISA法で検査する場合、抽出法Ⅱで試験溶液を調製することとした。

表4 抽出法Ⅱによる6農作物の添加回収実験
(単位：%)

試料の種類	無添加	カルバリル添加			
		5 ppb相当		40ppb相当	
	B/B ₀	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率
いちご	90.9	77.2	105	47.4	90
きゅうり	91.7	77.9	100	48.5	84
梨	95.4	77.6	102	48.3	85
ばれいしょ	97.1	79.5	90	48.5	84
ほうれん草	96.5	79.8	89	48.3	85
みかん	99.5	78.8	95	48.7	82
平均	95.2	78.5	97	48.3	85
±標準偏差	±3.3	±1.1	±7	±0.5	±3

3. 検出下限について

表4に示したように、抽出法Ⅱで試験溶液を調製した場合のカルバリル無添加のB/B₀の中で最も低かったのは、いちごの90.9%であった。標準偏差が3.3%であることを考えると、農作物によっては90%を下回ることも考えられた。

そこで、抽出法Ⅱを行った場合の検出下限は、B/B₀値が85%付近の濃度とした。表5に、抽出法Ⅱにおけ

表5 抽出法Ⅱにおける7農薬の検出下限

農薬名	検出下限 (ppm)
カルバリル	0.004
メチオカルブ	0.009
イソプロカルブ	0.02
クロルプロファミン	0.05
ベンダイオカルブ	0.1
フェノブカルブ	0.3
ピリミカルブ	2

る7農薬の検出下限を示した。

4. カルバリル以外の対象農薬における添加回収実験

抽出法Ⅱで試験溶液を調製し、中程度の感度であるクロルプロファミン、感度の悪いフェノブカルブとピリミカルブの3農薬について試料への添加回収実験を行った。試料には、カルバリルの添加回収実験と同様いちご、きゅうり、梨、ばれいしょ、ほうれん草、みかんの6種類を用いた。添加濃度は、直線性のある濃度範囲内で低濃度と高濃度の2段階で行った。その結果を表6に示した。

フェノブカルブ及びピリミカルブでは、低濃度及び高濃度の回収率は良好で76～127%であった。しかしクロルプロファミンでは、低濃度の回収率は90～110%と良好であったが、高濃度の回収率が極端に悪く6～18

%であった。また、農作物間の回収率には、大きな差が見られなかったため、いちごを用いてメチオカルブ、イソプロカルブ、ベンダイオカルブについても同様に添加回収実験を行った。その結果を、表6中のクロルプロファミン、フェノブカルブ、ピリミカルブのデータとあわせて表7に示した。

イソプロカルブやベンダイオカルブでは、低濃度と高濃度のどちらにおいても回収率は良好で93～107%であった。しかし、メチオカルブは、クロルプロファミンと同様、高濃度での回収率が悪く20%であった。

カルバリルやイソプロカルブ、ベンダイオカルブ、フェノブカルブ、ピリミカルブの5農薬については、この方法で充分定量可能であったが、メチオカルブやクロルプロファミンでは高濃度での回収率が悪く定量までいたらなかった。

表7 いちごにおけるカルバリル以外の6農薬の添加回収実験

農薬名	試料換算した添加濃度 (ppm)	B/B ₀ (%)	回収率 (%)
メチオカルブ	0.01	82.1	114
	0.1	74.9	20
イソプロカルブ	0.02	82.3	103
	0.1	64.7	93
クロルプロファミン	0.05	85.4	100
	1	81.6	8
ベンダイオカルブ	0.3	73.1	98
	1	57.7	107
フェノブカルブ	0.3	82.2	109
	5	54.9	92
ピリミカルブ	2	80.4	127
	10	67.3	113

IV ま と め

カルバリル検出キットを用いて、カーバメート系農薬7種を対象に、農作物中の残留農薬分析法の検討を行った。試料は、まずアセトンで抽出し溶媒留去後20%酢酸エチル/ヘキサン溶液に転溶し、さらにヘキサン/アセトニトリル分配を行い試験溶液とした。対象農薬7種についてそれぞれ直線性のある濃度範囲内で、低濃度と高濃度の2段階で添加回収実験を行ったところ、低濃度での回収率はいずれの農薬においても76～127%と良好であったことから、スクリーニング法としては充分活用できると思われた。

この方法で試験溶液を調製したときの対象農薬の検出下限と現在農作物に定められている基準値との関係を、表8に示した。ベンダイオカルブについては農作物の現基準を確認することはできなかったが、ピリミカルブについては、きゅうり及び白菜等一部の農作物に対して基

表6 3農薬における6農作物の添加回収実験

(単位: %)

試料の種類	クロルプロファミン添加				フェノブカルブ添加				ピリミカルブ添加			
	0.05 ppm 相当		1 ppm 相当		0.3 ppm 相当		5 ppm 相当		2 ppm 相当		10 ppm 相当	
	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率	B/B ₀	回収率
いちご	85.4	100	81.6	8	82.2	109	54.9	92	80.4	127	67.3	113
きゅうり	86.2	91	83.0	6	82.8	103	55.4	87	80.6	124	69.8	85
梨	85.3	101	81.1	8	81.6	116	52.8	112	84.6	76	68.3	101
ばれいしょ	84.9	105	73.4	18	82.0	113	54.5	95	81.2	116	68.5	99
ほうれん草	84.5	110	83.3	6	83.2	99	53.2	108	84.4	80	69.6	87
みかん	86.3	90	83.8	6	84.9	84	51.8	124	84.9	76	68.1	103
平均	85.4	100	81.0	9	82.8	104	53.8	103	82.7	100	68.6	98
±標準偏差	±0.7	±8	±3.9	±5	±1.2	±12	±1.4	±14	±2.2	±25	±0.9	±11

表8 対象農薬の検出下限と農作物の現基準との関係

農薬名	検出下限 (ppm)	農作物の現基準範囲 (ppm)		備考
		Min.	Max.	
カルバリル	0.004	0.1	1.0	農作物の基準のうち、最も低い基準値の1/5を確認可能
メチオカルブ	0.009	0.05	3.0	
イソプロカルブ	0.02		0.5	
クロルプロファム	0.05	0.05	50	農作物の基準のうち、最も低い基準値を確認可能
ベンダイオカルブ	0.1	0.02	0.05	農作物の基準値を確認不可能
フェノブカルブ	0.3	0.3	2.0	農作物の基準のうち、最も低い基準値を確認可能
ピリミカルブ	2	0.05	2.0	農作物の基準のうち、きゅうりや白菜等に関り基準値を確認可能

準値を確認することができた。また、他の5農薬については現基準のうち最も低い基準値を確認することができた。そのうちカルバリル、メチオカルブ、イソプロカルブの3農薬は、最も低い基準値の $\frac{1}{5}$ を充分確認できた。

しかし、高濃度の添加回収実験では、クロルプロファムやメチオカルブで回収率が悪く、高濃度域でのクリーンアップに問題があると考えており、検討の余地があった。

参 考 文 献

- 1) 津田ゆかり, 宮田昌弘, 岩田邦彦, 沖賢憲他8名: 食衛誌, Vol.33, No. 5, 458 - 466, 1992
- 2) Janet S. Colliss: Analytical Proceedings, Vol. 30, No. 2, 74 - 75, 1993
- 3) W. Harvey Newsome, Jupiter M. Yeung, and Peter G. Collins: Journal of AOAC International, Vol.76, No. 2, 381 - 386, 1993
- 4) Rodney J. Bushway, Barbara E. S. Young, Lance R. Paradis, Lewis B. Perkins, Susan K. Martin, and Myrna P. Brown: Journal of AOAC International, Vol.77, No. 5, 1237 - 1243, 1994
- 5) Rodney J. Bushway, Barbara E. S. Young, Lance R. Paradis, and Lewis B. Perkins: Journal of AOAC International, Vol.77, No. 5, 1243 - 1248, 1994
- 6) 高橋義行, 千田茂樹, 梅津透, 河野敏郎: 関東東山病虫害研究会年報第42集, 1995
- 7) 江崎好美, 長律子, 藤本和司, 藤本喬: 福岡市衛生試験所報, Vol.21, 71 - 81, 1996
- 8) 残留農薬簡易分析法開発検討委員会: 食品衛生研究, Vol.45, No. 9, 31 - 49, 1995