

# 残留農薬検査キット 「アグリケム<sup>TM</sup>」の開発

A Test Kit for Detecting Pesticide Residue,  
"AgriChem<sup>TM</sup>"



マイクロ化学技研(株)  
田澤英克  
Hidekatsu  
Tazawa



マイクロ化学技研(株)  
江端智彦  
Tomohiko  
Ebata



AT 研究所  
第2研究部  
高寺貴秀  
Takahide  
Takadera

## 1. はじめに

近年、輸入農産物の残留農薬、国内での無登録農薬使用や禁止された食品添加物の使用、さらには偽装表示といった食の安全を揺るがす事件が相次いでおり、消費者の「食の安全」に対する不安が高まってきている。これを受けて、決められた基準値以内で使用してよい農薬を一覧表に載せ、その他の農薬等が一定量以上含まれる食品の流通を原則禁止する、いわゆる「ポジティブリスト制度」が食品衛生法に導入された(2006年5月29日施行)。しかしながら、加工食品については原材料の検査結果が準用されており、十分な検査体制とは言い難く、中国製冷凍餃子中に混入した有機リン系農薬成分「メタミドホス」による薬物中毒事件を防ぐことはできなかった。このような経緯から、加工食品や飲料など従来は比較的検査の少なかった食品に対しても検査体制の再構築が掲げられるようになってきている。

現在、食品中の残留農薬検査は、通知法である機器分析法や簡易検査法によって行われている。機器分析法は所要時間、費用及び熟練を要することから検査の対象と頻度に限界がある。一方、簡易検査法は検出感度が低い、検査対象農薬数が少ないといった問題があった。そこで、マイクロ化学技研株式会社と関西ペイント株式会社は、機器分析法に用いる前処理を簡素化する技術と光硬化性樹脂による酵素固定化技術を応用して、簡便かつ高感度に残留農薬を目視で検出できる検査キット「アグリケム<sup>TM</sup>」(図1)を共同開発したので報告する。



図1 残留農薬(有機リン系・カーバメート系)検査キット「アグリケム<sup>TM</sup>」

## 2. 機能目標とコンセプト

「ポジティブリスト制度」では、農作物においては約135の分類と799農薬等(動物用医薬品、飼料添加物含む)について約100,000の残留基準が設定され、この基準を超えて残留農薬が検出された農作物や、リスト外の農薬が検出された農作物が流通することが禁止されている。一例として、表1に有機リン系農薬であるフェニトロチオン(MEP)の残留基準(「食品、添加物等の規格基準」(厚生省告示第370号)より抜粋)を示す。これと同様に、全ての農作物と農薬等に対して食品の規格としての判断基準が設けられることになった。残留農薬検査に関しては機器分析が通知法となっているが、前処理を含めると、検査に数日を要し、検査費用も平均5万円程かかる。従って、検査時間やコストの面において急激に検査数を増やすのは困難である。このことから、簡易法でのスクリーニング検査や自主検査などを検討する食品メーカー・検査機関等も多く見られるようになった。しかし、旧来の簡易検査キットは、検出感度が低いあるいは検査対象農薬の種類が少なすぎる等の問題を有しており、国の検査基準値を満たすことが困難であった。

今回紹介するキット「アグリケム<sup>TM</sup>」では、有機リン系農薬とカーバメート系農薬がコリンエステラーゼという酵素を阻害するという性質と、機器分析法に用いる前処理法を組み合わせることにより、簡易、かつ高感度に残留農薬を検出できることを特徴としている。

以下に、「アグリケム<sup>TM</sup>」による農薬測定に用いている各原理について詳述する。

### 2.1 検出原理

コリンエステラーゼは、コリンエステル類を有機酸とコリン類に分解する酵素である。神経組織においては、コリンエステラーゼの一種であるアセチルコリンエステラーゼによって神経伝達物質であるアセチルコリンが分解され、作用した後にすぐに消滅する。有機リン及びカーバメート系農薬は、コリンエステラーゼの働きを阻害する作用を有し、体内では縮瞳、痙攣、呼吸困難等の症状を引き起こす。本キットでは、この有機リン及びカーバメート系農薬によるコリンエステラー

表1 フェニトロチオン(MEP)の残留基準(抜粋)

食品名	基準値(ppm)
米(玄米)	0.2
小麦	10
大麦	5
ライ麦	1
とうもろこし	1
そば	1
その他の穀類	1
大豆	0.2
小豆類	0.2
えんどう	0.2
そら豆	0.2
らつかせい	0.2
その他の豆類	0.2
ばれいしょ	0.05
・	・
・	・
・	・

(「食品、添加物等の規格基準」(厚生省告示第370号)より抜粋)

ゼ阻害作用を利用して、これら農薬の検出を行っている。具体的には、**図2**に示すように底部に光硬化性樹脂によってコリンエステラーゼが固定化されたマイクロチューブ(「アグリケム™」本体)にサンプル(試料)添加して静置後、コリンエステラーゼによって青色に発色する基質(発色試薬)を加える。農薬が存在しなければ固定化コリンエステラーゼ層が青く発色するが、農薬によってコリンエステラーゼの働きが阻害されていれば無反応となり青色の発色が認められない。

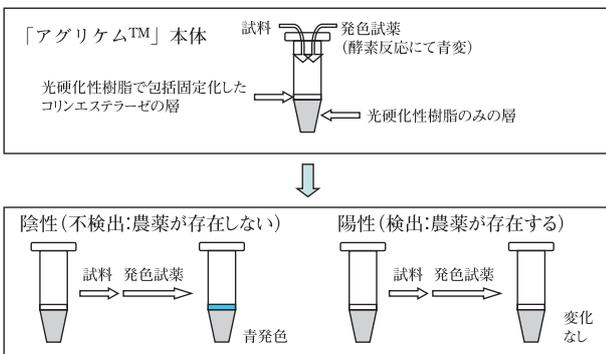


図2 有機リン系・カーバメート系農薬の検出

### 2.2 コリンエステラーゼの固定化

一般的な簡易検査法では、その多くが液体の比色を判定する方式をとっており、正確なピペッティング操作を複数回行う必要がある等、操作性に問題を抱えている。そこで本キットでは固定化酵素の適用により操作性の向上を図った。操作性のほかにも固定化酵素に求められる要求性能としては、酵素反応を阻害しないこと、青色の発色が目視で判定しやすいこと、長期保存可能であること、などがある。これらの項目をすべて満足させるために、酵素や微生物の固定化で既に実績のある関西ペイント(株)の光硬化性樹脂を用いて固定化することにした。光硬化性樹脂は酵素を包括固定化でき、硬化すると半透明から白色の含水ゲルとなるため、ごく少量

の固定化酵素の層でも十分に青色の発色が目視判定できることが分かった。しかし、ごく少量の固定化酵素層のみでは、保存期間中の乾燥により支持体チューブより剥がれ落ちかつ酵素の安定性が低下する現象が認められたことから、物理的安定性の向上及び水分補給を目的として固定化酵素層の下に酵素が固定化されていない光硬化性樹脂だけの層を配置した。このような2層構造にすることにより、固定化酵素の乾燥を防ぎかつ目視判定もさらに容易にできるようになった。また、併せて固定化酵素層の光硬化性樹脂も最適化した結果、**表2**に示すように、25℃以下では6ヶ月以上の長期間にわたり保存可能であることがわかった。保存安定性については今後も継続調査し、限界を把握する予定である。

表2 「アグリケム™」の保存安定性

保存温度(℃)	保存期間(日)						
	0	7	14	30	60	90	180
4	++	++	++	++	++	++	++
25	++	++	++	++	++	++	++
37	++	++	++	+	+	+	+
50	++	++	-	-	-	-	-

保存安定性は酵素反応の発色で評価した。  
++は良好な発色、+は弱い発色、-は発色不良を示す。

### 2.3 前処理法

農薬を高感度で検出するためには、サンプル中の農薬を濃縮する必要がある。本キットでは、**図3**に示すカラムシリンジを用いて、農薬の濃縮を行っている。このカラムシリンジは、先端に逆相担体(カラム)が結合したマイクロピペットチップとディスプレイブルシリンジからなる。このカラムシリンジに10 mlの農薬抽出液を複数回吸引・排出することによって抽出液中の農薬をカラムに吸着させ、次に0.1 mlの溶出液で溶出することにより、抽出液中の農薬を最大100倍濃度に濃縮することが可能となる。

さらに、チオノ体の有機リン系農薬については十分な酵素阻害活性を得るためにオキソン体に変換する必要がある(活性化)。本キットでは、カラムに活性化液を通すことによりカラムに吸着した農薬の活性化を行っており、操作の簡易性を実現している。

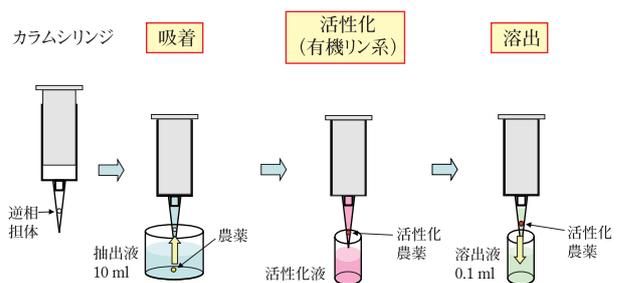


図3 農薬の濃縮及び活性化

表3 今回検討を行った有機リン系農薬及びカーバメート系農薬

有機リン系農薬 (58種類)		カーバメート系農薬 (16種類)	
EPN	シアノホス	フェンスルホチオン	BPMC (フェノブカルブ)
アジンホスエチル	ジクロフェンチオン	フェンチオン	MIPC
アジンホスメチル	ジクロロボス (DDVP)	フェントエート	NAC (カルバリル)
アセフェート	ジスルホトン	ブタミホス	PHC
イソキサチオン	ジメチルビンホス (E)	プロチオホス	XMC
イソフェンホス	ジメチルビンホス (Z)	プロパホス	アラニカルブ
イプロベンホス	ジメトエート	プロフェノホス	アルジカルブ
エチオン	スルプロホス	プロモホスエチル	エチオフェンカルブ
エディフェンホス	ダイアジノン	ホサロン	オキサケミル
エトプロホス	チオメトン	ホスチアゼート	カルボスルファン
エトリムホス	テルブホス	ホスファミドン	カルボフラン
オメトエート	トリクロホスメチル	ホスメット (PMP)	チオジカルブ
カズサホス	バミドチオン	ホルモチオン	ピリミカーブ
キナルホス	パラチオン	ホレート	ベンフラカルブ
クマホス	パラチオンメチル	マラチオン	メソミル
クロルピリホス	ピラクロホス	メタミドホス	メチオカルブスルホン
クロルピリホスメチル	ピリダフェンチオン	メチダチオン (DMTP)	
クロルフェンビンホス	ピリミホスメチル	モノクロトホス	
サリチオン	フェナミホス		
シアノフェンホス	フェニトロチオン		

### 3. 性能

#### 3.1 「アグリケム™」の評価試験

##### 3.1.1 検出限界の評価試験

表3に示した有機リン系農薬とカーバメート系農薬の74種類の農薬について、0.1 ppb~100 ppmの水溶液を農薬標準品(和光純薬工業株式会社製など)より作製し、標準農薬溶液として各農薬の検出限界を確認した。操作は、製品添付の取扱説明書に示された以下の方法によって行った(図4)。

- ①農薬の濃縮:農作物より農薬が抽出された抽出液10 mlを、カラムが先端についたシリンジ(カラムシリンジ)を用いて複数回吸引・排出し、サンプル液中の農薬をカラムに吸着させた。
- ②チオノ体有機リン系農薬の活性化:カラムに調製済み活性化液を吸引・排出した後、水洗及び水切りを行った。

③農薬の溶出及び酵素阻害反応:カラムシリンジ先端のカラムに濃縮された農薬を、0.1 mlの溶出液をカラムに複数回吸引・排出を行うことによって溶出し、準備済みの「アグリケム™」内に投与した。そして投与後15分間待つことにより酵素阻害反応を行った。

④発色反応:酵素阻害反応終了後、発色(試薬)液を滴下して15分間待つことによりコリンエステラーゼの発色反応を行った。

⑤判定:上層の発色を色インデックスカードと照合して、陰性(不検出)、弱陽性(疑わしい)、及び陽性(検出)の3段階判定を行った。なお、本キットでは「弱陽性」及び「陽性」と判定された場合は公的機関での機器分析を行うことを推奨しているため、「弱陽性」と判定された濃度以上で「検出可能」と判断した。

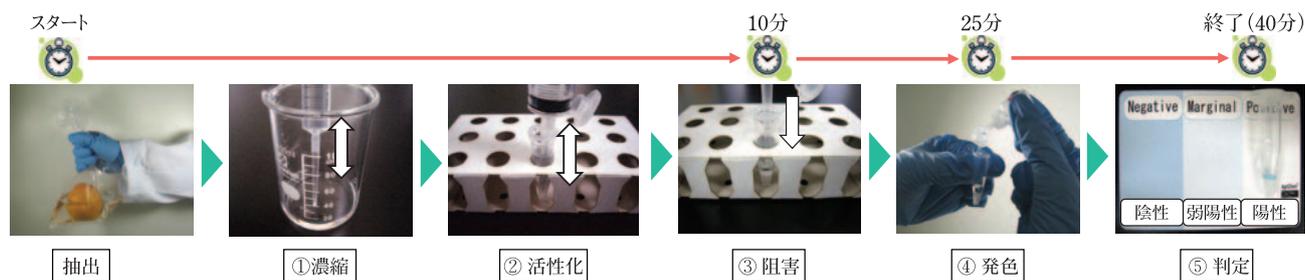


図4 「アグリケム™」による農薬検出

新技術

### 3.1.2 前処理法の評価試験

フェニトロチオン (MEP) を 1 ppm となるように添加したキャベツ 1 g に対し、精製水、水道水、メタノール、またはアセトニトリル 5 ml を添加して、0.5～30 分間、振盪抽出を行った。そして、抽出液中に含まれる MEP を SmartAssay 高感度フェニトロチオンキット (株式会社堀場製作所製) を用いて定量した。各条件における抽出効率 (%) は次式により求めた。

$$\text{抽出効率(\%)} = \frac{(\text{抽出液中の MEP 濃度}(\mu\text{g/ml}) \times 5\text{ml})}{(\text{添加した MEP}(1\mu\text{g}))} \times 100$$

## 3.2 「アグリケム™」の評価結果

### 3.2.1 各農薬の「アグリケム™」による検出限界

有機リン系 58 農薬及びカーバメート系 16 農薬の計 74 農薬について、「アグリケム™」による検出限界の検討を行った結果、検出可能であった農薬とその検出限界を表 4 に示す。今回、検討した 74 種類の農薬のうち、アジンホスエチルを始めとする 18 農薬 (表 4 で赤字表示) については、一律基準である 10 ppb の濃度で「アグリケム™」によって検出できることが明らかとなった。さらに、EPN を始めとする 20 農薬 (表 4 で黒字表示) については、「アグリケム™」によって一律基準である 10 ppb の濃度では検出できないものの 100 ppb 以下の濃度では検出でき、作物によっては残留基準値以下の濃度で検出できることが明らかとなった。以上の結果から、「アグリケム™」によって、表 4 に示した 38 農薬について 100 ppb 以下の濃度で検出が可能であり、同原理のキットで

は最大の対象農薬数・最高の検出感度であった。従って、「アグリケム™」は、これら 38 農薬の農作物中残留農薬スクリーニング検査に適用可能であると考えられた。

一方、他の農薬では、検出限界は 100 ppb 以上であった。これは、酵素阻害活性が低いことや逆相担体への吸着や溶出が不十分なため、農薬が濃縮されていないといった原因が考えられた。特に、水溶性の高い農薬については、逆相担体への吸着が不十分である可能性が強く示唆された。今後、検出感度の低い農薬については、担体の検討や抽出液の検討を行うことにより、高感度化を図っていく予定である。

### 3.2.2 農作物からの農薬抽出条件

MEP を用いて、キャベツ中からの添加回収試験を各種溶媒で行った結果、水を抽出溶媒として用いた場合においても、キャベツ中の MEP は高い回収率を示した (表 5)。コリンエステラーゼの酵素反応は、高濃度のメタノールやアセトニトリルにて阻害されることから、「アグリケム™」用の抽出液の調製には、抽出溶媒として水を用いることとした。

表 5 キャベツ中の MEP の各溶媒による抽出効率

溶 媒	抽出効率 (%)
蒸 留 水	100
水 道 水	104
メ タ ノ ー ル	113
アセトニトリル	105

表 4 「アグリケム™」で検出できる農薬

農 薬 名	主な商品名	検出限界 (ppb)		農 薬 名	主な商品名	検出限界 (ppb)	
		弱陽性	陽性			弱陽性	陽性
EPN	EPN	40	60	ダイアジノン	ダイアジノン	0.6	0.8
アジンホスエチル	Riazotion	1	2	テルブホス	Counter	10	60
アジンホスメチル	グチオン	8	10	パラチオン	パラチオン	0.8	1
イソキサチオン	カルホス	0.2	0.6	ピリダフェンチオン	オフナック	1	2
エチオン	エチオン	10	20	ピリミホスメチル	アクテリック	N.D.	20
エトプロホス	モーキャップ	100	200	フェナミホス	フェナミホス	4	6
エトリンホス	エカメット	N.D.	10	フェニトロチオン	スミチオン	40	80
キナルホス	エカラック	0.1	0.4	フェンスルホチオン		100	200
クマホス	クマホス	2	6	ブタミホス	ブタミホス	100	400
クロルピリホス	ダーズバン	0.2	0.4	プロパホス	カヤフォス	1	6
クロルピリホスメチル	レルダン	1	2	プロモホスエチル	ルビトックス	10	20
クロルフェンビンホス	ビニフェート	N.D.	40	ホサロン	ホサロン	6	8
サリチオン	サリチオン	100	200	ホレート	ホレート	80	100
シアノフェンホス		100	200	モノクロトホス	アルフェート	N.D.	100
ジクロフェンチオン	ノマート	100	200	NAC※	NAC	100	N.D.
ジクロルボス※	DDVP	40	N.D.	オキサミル※	バイデート	100	N.D.
ジメチルピンホス (E)	ランガード	100	200	カルボフラン※	フラダン	20	N.D.
ジメチルピンホス (Z)	ランガード	100	200	チオジカルブ	ラーピン	20	N.D.
スルプロホス	ボルスタール	20	60	ピリミカーブ	ピリマー	8	10

N.D. not done

※カラムシリッジを使用せず検出

表6 キャベツ中のMEPの水抽出時間と抽出効率

振盪時間 (min)	抽出効率 (%)
0.5	81
10	91
20	91
30	89

また、抽出時間を各種設定して検討した結果、0.5分間の振盪抽出においても、キャベツ中のMEPは高い回収率を示した(表6)。さらに、抽出液中の農薬濃度を濃くするため、抽出に用いる水を作物と等量に減らして検討を行ったところ、同様に良好な回収率であった。

以上の結果から、「アグリケム™」による測定のための農作物からの農薬抽出は、等量の水で30秒間強く攪拌することにより行う方法を標準法とした。また、サンプルによっては、操作に支障がでる残骸を除去するために、キット添付のろ過フィルターにより抽出液をろ過することとした。

本キットでは標準法として、水で抽出する方法を提示しているが、水による抽出でも機器分析用の通知である厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「食品中に残存する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(食安発第1115001号)の評価基準にある回収率の目標値70~120%はクリアしており、生鮮野菜におけるMEP測定においては水抽出でも使用に問題ないことが示された。しかしながら、測定する農薬や食品によっては、本標準法によって十分な農薬抽出効率が得られない可能性がある。従って、扱うサンプルによってはホモジナイズや有機溶媒抽出等、ある程度の前処理を行う必要があると考えられる。今後、種々の農薬や生鮮農作物及び加工食品等を用いた検討や通知法の処理方法とのバリデーションを行っていく予定である。

## 4. あとがき

中国産餃子による薬物中毒事件以降も次々と食に関する問題が明らかになってきており、消費者の「食の安全」に対する注目度の高まりとともに、その信頼度は厳しいものとなってきている。農作物における残留農薬検査に関しては、現状では機器分析の検査数を大幅に増加させることは非常に困難であるが、「アグリケム™」を用いることにより有機リン系、カーバメート系の残留農薬を高感度かつ簡易に数多く検査することが可能となる。

また、加工食品においても、「アグリケム™」はその特徴より、機器分析法に比して夾雑物の影響を受けにくいと、前処理が比較的簡単に済み、これら加工食品の検査にも適用できる可能性が高い。消費者の食に対する信頼感を得るためには、検査の絶対数を増やすことにより「食の安全」をアピールすることが重要になると思われるので、「アグリケム™」のような高感度な簡易検査の普及が期待される。

## 参考文献

- 1) 田澤英克、高寺貴秀:食品と容器、49[9]、543-546 (2008)
- 2) 田澤英克、宮田直紀、高寺貴秀、江端智彦:第31回 農薬残留分析研究会講演要旨集、250-257 (2008)