

生産地で実施できる残留農薬の出荷前検査法

農業・園芸総合研究所

1 取り上げた理由

農作物の安全性評価に関する手段の一つとして、残留農薬分析があげられるが、従来の分析では高価な機器、高度な専門知識、多くの時間を要するため生産現場での対応は困難であった。近年、イムノアッセイによる残留農薬分析キットが開発され、機器分析に比べて安価で簡便な分析法として注目されている。ホリバ・バイオテクノロジー社のアセタミプリドキット、SDI社のメトラキシルキットを使用して、残留農薬を生産地で作物の出荷前に検査できる技術として確立したので普及技術とする。

2 普及技術

1) 残留農薬簡易分析キット

a ホリバ・バイオテクノロジー社 アセタミプリドキット

対象農薬：モスピラン

特徴：プレートタイプ，モノクローナル抗体

測定範囲：0.3～4ppb

対象作物例と基準値：ハクサイ，トマト，イチゴ 5ppm（残留農薬基準値）
ハウレンソウ，ネギ 5ppm（農薬登録保留基準値）

b SDI社 メトラキシルキット

対象農薬：リドミル

特徴：チューブタイプ，ポリクローナル抗体

測定範囲：0.5～50ppb

対象作物例と基準値：玄米0.1ppm，イチゴ1ppm

ハウレンソウ，ネギ，ハクサイ，ナス，トマト，ニンジン，シュンギク 2ppm
（全て農薬登録保留基準値）

分析キット内容は表1，分析キットを用いた分析値は機器分析値と一致する（表3）。

表1 残留農薬分析キット

メーカー	分析キット名	キット内容
ホリバ・バイオテクノロジー社	アセタミプリドキット	抗体プレート（8ウェル×12列） 標準試薬L.H、酵素液、洗浄試薬、発色試薬 発色停止試薬、プレートシール
SDI社	メトラキシルキット	チューブ（108本）、酵素標識抗体、 磁性抗体、洗浄液、発色液、反応停止液 （メトラクロール用標準液*）

*メトラキシルキットではメトラクロールも測定でき、付属している標準液はメトラクロール用である。

2) 残留農薬簡易分析に必要な主な機材および消耗品

a 機材：包丁，まな板，ミキサー，（ブレンダー，40メッシュふるい：玄米適用時），薬匙，はかり，50mlメスシリンダー，振とう機，マイクロピペット（20～200μl，100～1000μl，1～5ml），洗浄機，アスピレーター，吸光度計，（マグネットラック，試験管ミキサー：SDIのみ）

平成16年4月作成

b 消耗品：残留農薬分析キット，50ml遠沈管，10mlシリンジ，ねじ口びん，マイクロピペット用チップ，メタノール（残留農薬試験用），蒸留水

3) 試料の前処理方法

a 採取：個体により濃度が違っていることもあるので，1検体あたり5個以上を採取する。なお，作物残留分析では，試料は一般的に1kg以上必要とする。

b 調整：各作物は市場へ出荷する状態とする。各作物の分析部位は図1のとおりである。

c 均一化：

(1)ホウレンソウ，ネギ，ハクサイ，ナス，トマト，ニンジン，シュンギク，イチゴ：

調整試料全体または一部を適当な大きさに切ってミキサーで磨砕して均一なペースト状にする。

一部を磨砕する場合は，個々の試料を均等に縦に分割し（2～8分割），それぞれの1～2片ずつを取り合わせて均一化試料とする（図2）。

(2)玄米：

ブレンダーで粉砕後，40メッシュのふるいを通す。

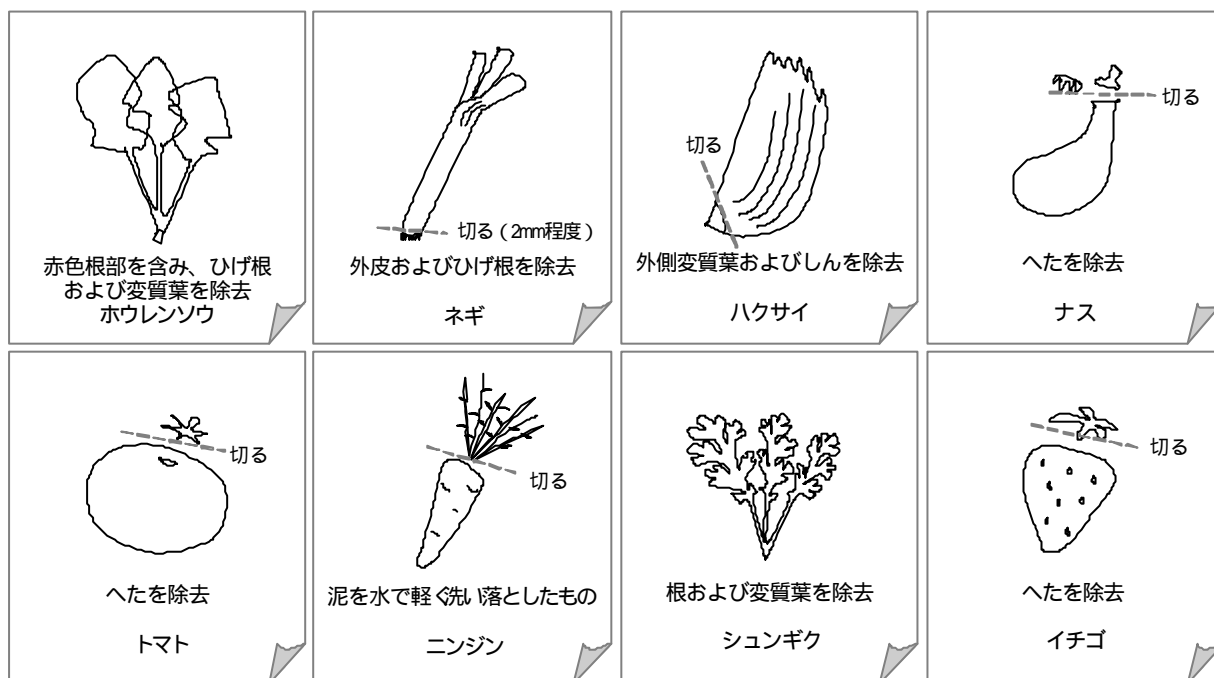


図1 各作物の分析部位

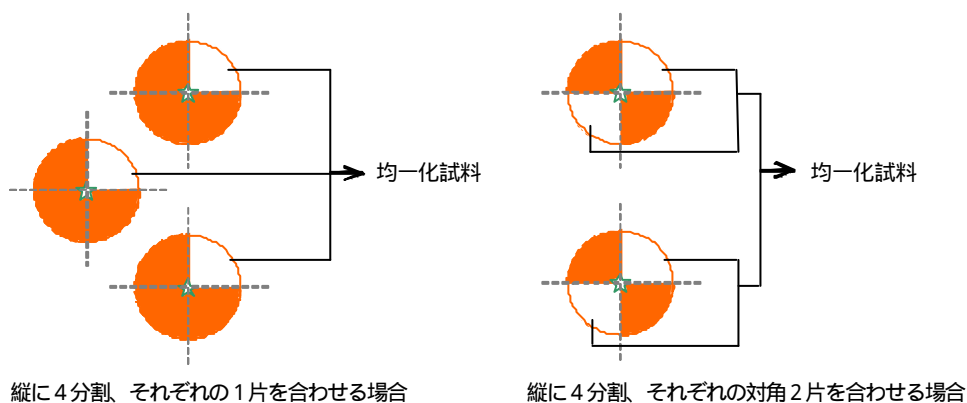


図2 調整試料の一部を磨砕、均一化する方法

4) 抽出・希釈方法

抽出・希釈の基本操作は図3のとおりである。

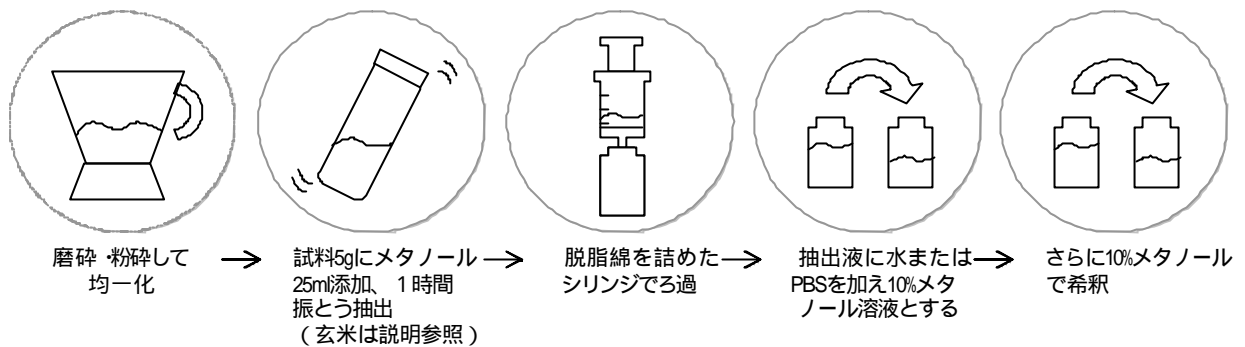


図3 抽出 希釈の基本操作

a キット以外の試薬の準備

- (1)10%メタノール（抽出液の希釈時に使用）：メタノール1に対して蒸留水9を混合する。
- (2)メタラキシル標準液H,L（メタラキシルキットで使用）：ねじ口びんにメタラキシル500ppbメタノール溶液（問い合わせ先：農園研）をマイクロピペットで200 μ l採取，蒸留水をマイクロピペットで1800 μ l加えて混合し，標準液H（50ppb，10%メタノール溶液）とする。別のねじ口びんに標準液Hをマイクロピペットで20 μ l採取，10%メタノールをマイクロピペットで1980 μ l加えて混合し，標準液L（0.5ppb，10%メタノール溶液）とする。
- (3)PBS（メタラキシルキットでイチゴ測定時に使用）：0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)に0.15MとなるようにNaClを溶かしたもの。市販もされている。
- (4)60%メタノール（メタラキシルキットで玄米測定時に使用）：メタノール6に対して蒸留水4を混合する。

b アセタミプリドキット（ホリバ）

(1)ホウレンソウ，イチゴ，ネギ，ハクサイ，トマト

磨砕した試料5gを遠沈管にとり，メスシリンダーでメタノール（原液）25mlを添加，振とう機で1時間振とう抽出する。

脱脂綿を先端に詰めたシリンジに抽出液を入れピストンで押し出してろ過する。

ねじ口びんに蒸留水をマイクロピペットで7.5ml採取，ろ過した抽出液をマイクロピペットで1000 μ l加えて混合する（10%メタノール溶液となる）。

別のねじ口びんに10%メタノールをマイクロピペットで4.9ml採取，の抽出液をマイクロピペットで100 μ l加えて混合する（さらに1/50希釈となる）。

c メタラキシルキット（SDI）

(1)ホウレンソウ，ネギ，ハクサイ，ナス，トマト，ニンジン，シュンギク：

～ はアセタミプリドキット（b ， ）と同じ。

別のねじ口びんに10%メタノールをマイクロピペットで1.9ml採取，の抽出液をマイクロピペットで100 μ l加えて混合する（さらに1/20希釈となる）。

(2)イチゴ：

， はアセタミプリドキット（b ， ）と同じ。

ねじ口びんにPBSをマイクロピペットで7.5ml採取，ろ過した抽出液をマイクロピペットで1000 μ l加えて混合する（10%メタノール溶液となる）。

別のねじ口びんに10%メタノールをマイクロピペットで900 μl採取， の抽出液をマイクロピペットで100 μl加えて混合する（さらに1/10希釈となる）。

(3) 玄米：

粉碎した試料5gを50ml遠沈管にとり，蒸留水をマイクロピペットで5ml添加，混合して30分間放置する。メスシリンダーで60%メタノール25mlを添加，振とう機で1時間振とう抽出する。

脱脂綿を先端に詰めたシリンジに抽出液を入れピストンで押し出してろ過する。

ねじ口びんに蒸留水をマイクロピペットで4ml採取，ろ過した抽出液をマイクロピペットで1000 μl加えて混合する（10%メタノール溶液となる）。

別のねじ口びんに10%メタノールをマイクロピペットで2.3ml採取， の抽出液をマイクロピペットで1000 μl加えて混合する（さらに1/3.3に希釈となる）。

各処理フローは図4のとおりである

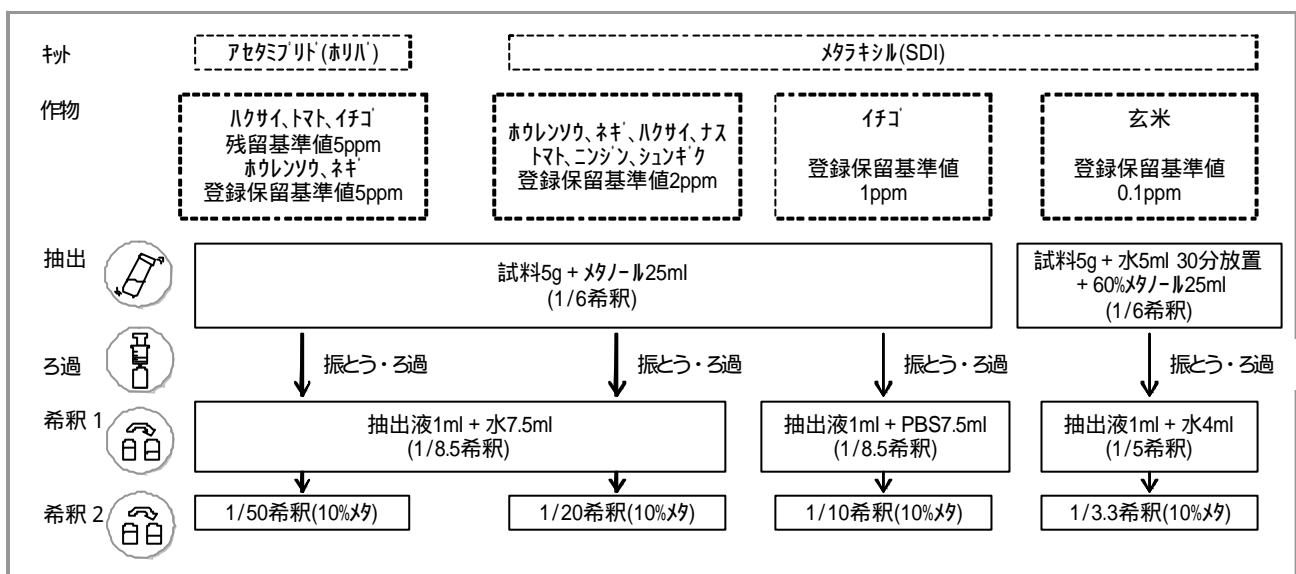


図4 抽出 希釈処理フロー

5) 測定方法

a 分析キットの使用法と注意点：

各キットを用いた測定フローおよび注意点は図5，6のとおりである（詳細は各説明書参照）。操作上次の点に注意する。

ピペットによる採取量を一定とする。

洗浄液が残らないようにする。

発色液を入れてから停止液を入れるまでの発色反応時間を一定にする。

特にメラキシルキットでは，1列分注するのに時間がかかるため発色反応時間を一定にしにくい。発色液および停止液は1列2分（または3分）の間隔として列始めの時間を揃えて分注し，列始めでは発色反応時間が一定となるようにする（表4）。なお，攪拌は1列ごとに行う。

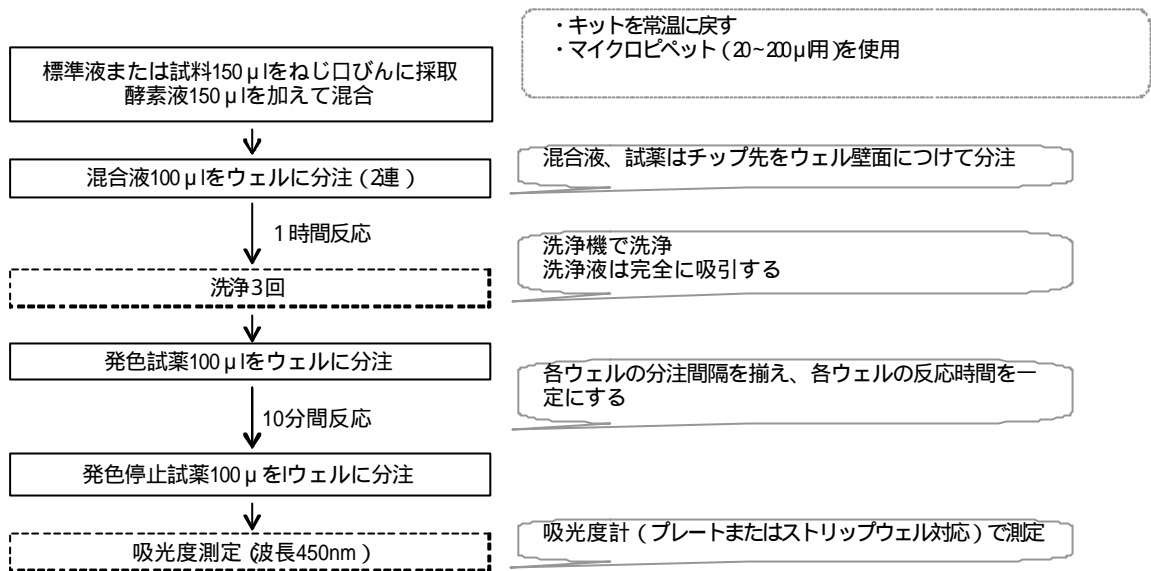


図5 アセタミプリドキット (ホリバ、プレートタイプ) の測定方法と注意点

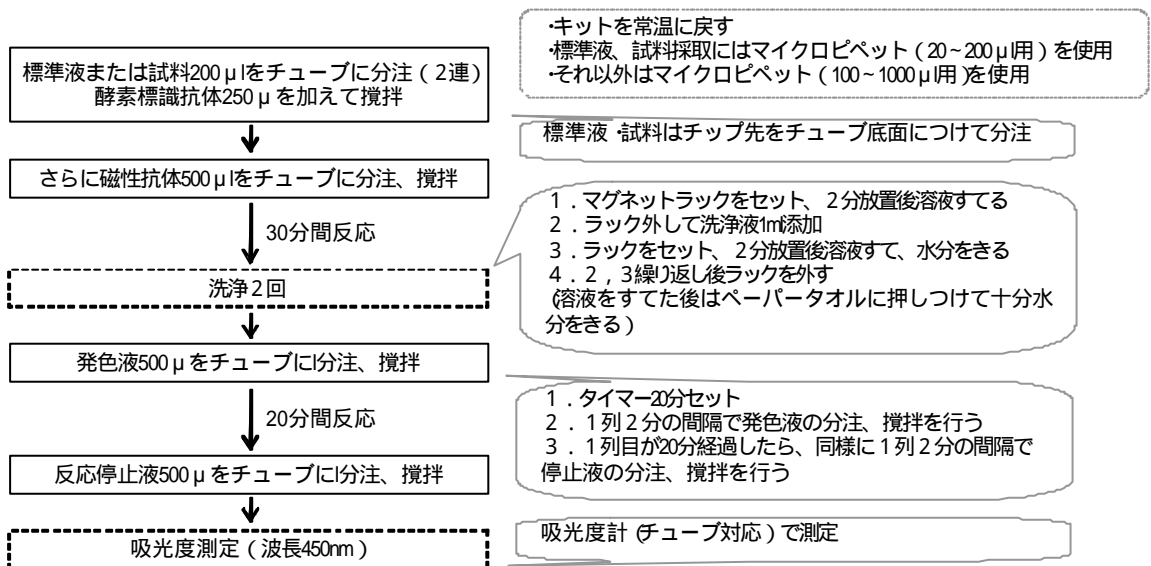


図6 メタラキシルキット (SDI、チューブタイプ) の測定方法と注意点

b プレートおよびチューブへの分注順番 :

図5, 6における測定方法 (プレートのウェルおよびチューブへの分注) において, アセタミプリドキット (ホリバ, プレートタイプ) では2連縦2列ごと分注, 列始めに標準液L, Hの酵素混合液を分注する。メタラキシルキット (SDI, チューブタイプ) では2連横1列ごと分注, 列始めに標準液L, Hを分注する。各キットの分注順番は図7のとおりである。分注順番が後になるほど同濃度溶液でも吸光度が低下するので, 2列ごとに検量線を作成する (図9)。

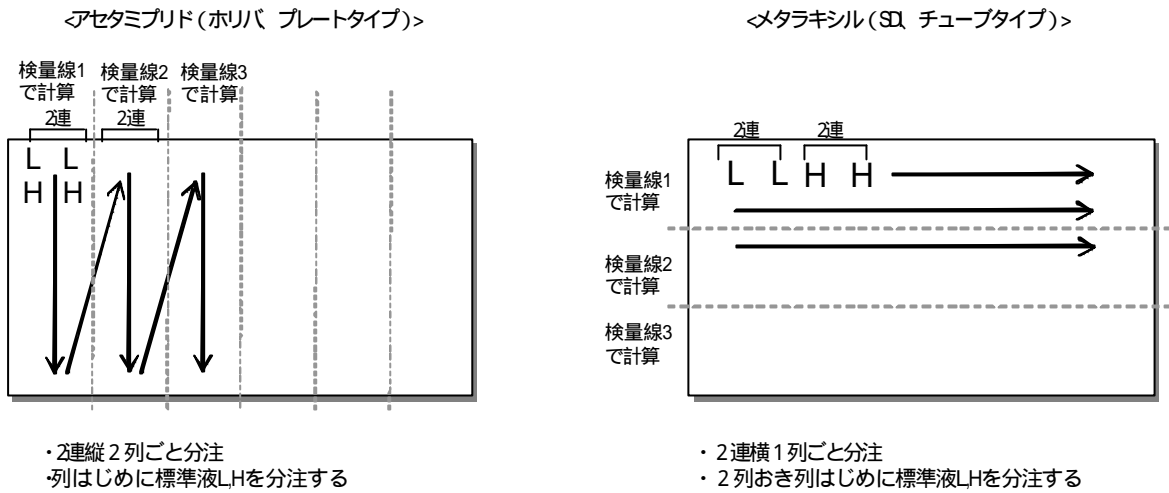


図7 プレートおよびチューブへの分注順番

6) 濃度の計算方法

検体の濃度の求め方は次のとおりである。

2連で測定した標準液および試料の吸光度の平均値を求める。

片対数グラフの横軸(対数)に標準液L,Hの濃度,縦軸に吸光度平均値をとり,検量線を作成する。検量線は右下がりの直線となる。

検量線に試料の吸光度平均値をあてはめ,試料の濃度を読み取る。

試料の濃度に希釈倍率をかけ,検体の濃度とする。

計算例は図8,計算に用いる希釈倍率は表2のとおりである。玄米の場合は抽出液の影響が大きく定量ができないため,試料の濃度2ppbを判定基準とする(図10)。

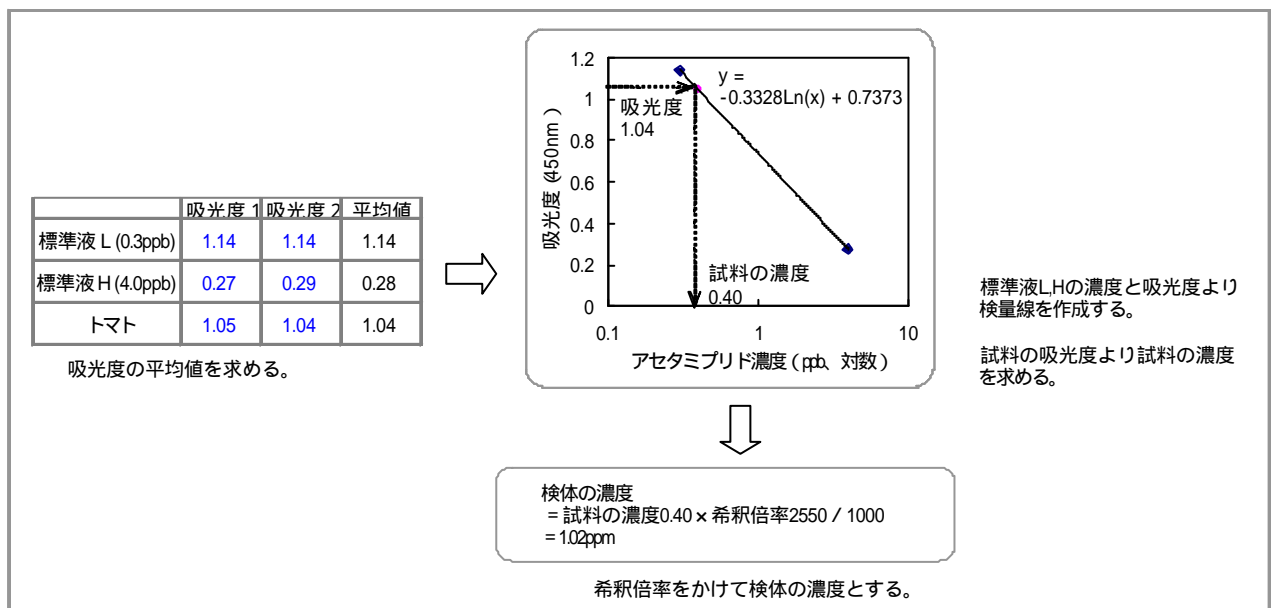


図8 検体の濃度の計算例(アセタミプリドキット、トマトの場合)

表2 検体の濃度の計算方法

分析キット	作物	基準値	試料の希釈倍率	検体の濃度の計算方法
アセタミプリド (ホリバ)	ハクサイ、トマト、イチゴ	5ppm (残留基準値)	2550倍	検体の濃度(ppm) = 試料の濃度 × 2550 / 1000
	ホウレンソウ、ネギ	5ppm (登録保留基準値)		
メタラキシル (SDI)	ホウレンソウ、ネギ、ハクサイ、ナス トマト、ニンジン、シュンギク	2ppm (登録保留基準値)	1020倍	検体の濃度(ppm) = 試料の濃度 × 1020 / 1000
	イチゴ	1ppm (登録保留基準値)	510倍	検体の濃度(ppm) = 試料の濃度 × 510 / 1000
	玄米	0.1ppm (登録保留基準値)		試料の濃度2ppbを判定基準とする

添加回収試験ではこれらの方法で玄米以外、概ね70～120%の回収率が得られる(表5)。

3 利活用の留意点

- 1) 残留農薬分析キットは、現在SDI社よりアメリカで使用される農薬に対応する40数種類のキット(主に環境試料用)、ホリバ・バイオテクノロジー社より国内対応の13種類のキットが発売されている。
- 2) 分析キットは食品衛生・環境等に係わる自主検査用である。
- 3) 分析キットを利用すると分析所要時間は最短で約2時間である。
- 4) 初期費用は、ホリバ製計算ソフトを使用する測定装置を導入する場合、機材がおよそ150万円、キット以外の消耗品が5万円、1キットが10万円である。市販吸光度計(1サンプルずつ測定するタイプ)を導入する場合、機材は最低でおよそ60万円となる。1キットでの測定検体数はアセタミプリドキットで36検体、メタラキシルキットで40検体程度である。消耗品を使い捨てにした場合、サンプル1点あたりおよそ3,200円となる。
- 5) キットに含まれる酵素液など粘性の高い溶液では、ピペットによる採取量の誤差が大きくなりやすいので、採取時のピペット角度および分注速度を一定にするように注意する(表6)。
- 6) キットは冷蔵保有し、測定前に使用する分の溶液だけ常温に戻す。
- 7) キットは使用期限内に使い切る。なお期限内の保管でも検量線の直線性が低下する場合がありますので注意する(図11)。
- 8) 廃液は回収し、処理業者に依頼する。

(問い合わせ先: 宮城県農業・園芸総合研究所 園芸環境部 電話022-383-8123)

4 背景となった主要な試験研究

1) 残留農薬簡易分析法を活用した農作物の安全性評価技術の確立 (平成13~15年)

2) 参考データ

表3 残留農薬分析キットと機器分析との分析値の比較 (メタラキシルキット使用)

作物	機器分析値 ppm	分析キット測定値			標準 偏差値	測定値/ 機器分析値
		1回目 ppm	2回目 ppm	2回AVG ppm		
ゼリA	1.15	0.76	1.13	0.95	0.26	0.82
ゼリB	0.35	0.36	0.40	0.38	0.02	1.09

表4 プレート分注時に生じる反応時間のずれ

	4列連続分注した場合 の最大時間差	
	列始めの時間を揃えた 場合の最大時間差 秒	場合の最大時間差 秒
A氏	5	5
B氏	54	11
C氏	13	3

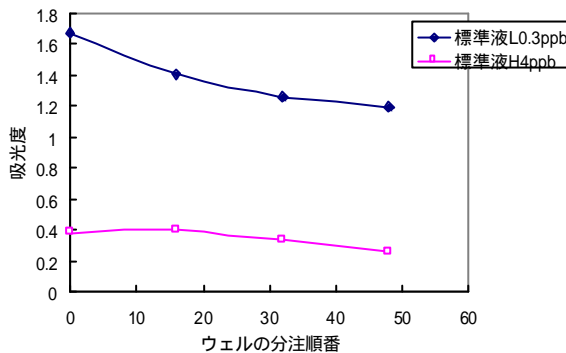


図9 分注順番による吸光度のずれ (アセタミプリドキット)

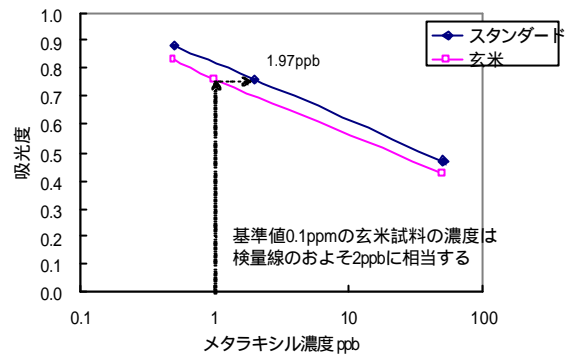


図10 玄米希釈倍率全99倍としたときの判定方法

表5 検討条件での添加回収試験結果

残留農薬 分析キット	作物	添加濃度	回収率平均 %	標準 偏差値
アセタミプリドキット	ホウレンソウ	2.5ppm	89	13.6
	イチゴ	2.5ppm	77	7.4
	トマト	2.5ppm	75	2.2
	ネギ	2.5ppm	92	13.1
	ハクサイ	2.5ppm	93	23.0
メタラキシルキット	ホウレンソウ	1.0ppm	104	13.1
	イチゴ	0.5ppm	123	11.4

表6 初心者によるピペット操作の変動係数 (100 μlを20回採取)

	変動係数 %			
	メタノール 10%	停止液	発色液 (やや粘性)	酵素 (粘性高い)
A氏	0.28	0.29	0.82	1.69
B氏	0.19	0.27	0.37	1.54

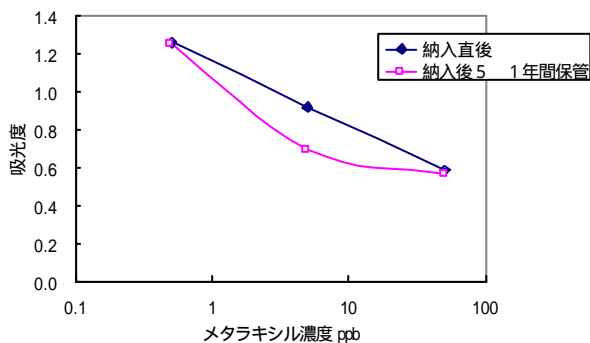


図11 保管期間による反応性の違い (メタラキシルキット)

3) 発表論文等

なし