

ガスクロマトグラフ法とイムノアッセイ法を用いた土壌および キュウリ試料中のディルドリン分析の比較

橋本良子

(東京都農業試験場)

Comparison of Gas Chromatography and Immunoassay Methods for Measuring Dieldrin in Soils or Cucumbers.

Yoshiko HASHIMOTO¹

Abstract

The objective of this report is to evaluate the effectiveness of the immunoassay method as an alternative to the gas chromatographic analytical method for rapid screening of dieldrin residues in soils and cucumbers. The values obtained by analysis with both methods were very similar. There was a high correlation of values obtained by both methods in the range of 0.08-0.3ppm from soil samples. A correlation in the values of both methods did not occur in the range of 0.03-0.08ppm. As for the values from cucumber analysis, there was a correlation in the values for the two methods in the range of 0.01-0.05ppm. However, the immunoassay method tended to have larger values than the chromatographic method with substantial variation. Samples with low levels of residues of must be concentrated for accurate analysis with the immunoassay method. It is necessary to include a procedure to remove impurities when the sample is concentrated. Impurities will affect the analysis values.

有機塩素系殺虫剤のディルドリンは、2001年に採択された残留性有機汚染物質 (POPs: Persistent Organic Pollutant) 条約で対象とされた12物質の中に含まれており、国際的に協調して廃絶、削減等を行う必要が唱えられている物質である (Jorgenson, 2001)。東京都では2001年および2002年の食品衛生法に基づく残留農薬検査において、東京都産のキュウリから残留基準値を超えるディルドリンが検出された。ディルドリンは1975年に登録失効していることから、土壌に長期間残留していたものが農作物に残留したと考えられた。この事態を受けて、東京都は都内全域の土壌調査を行ったが、調査した土壌サンプルの10.4%からディルドリンが検出された (2003年2月、東京都産業労働局報道発表)。各種の農作物の中でもキュウリは特にディルドリンを吸収しやすいことが報告されている (四国地域技術連絡会議, 1973)。農作物の安全性を確保する

には、今後さらに迅速な分析が必要になる。

ディルドリンの分析は他の農薬と同様に機器分析で行われているが、時間と費用がかかることが指摘されている (Azza, 1994)。一方、近年イムノアッセイ法の使用が広まり、残留農薬分析法としての有効性が検討されてきている (高橋ら, 1995)。しかし、検体中の夾雑物が分析結果に影響を与え得ることから、実検体を用いて分析の性能を調べるのが非常に重要である (Kaufman and Clower, 1995; 湯浅, 1998)。そこで、本研究では市販の残留農薬測定キットを用いて土壌およびキュウリ試料におけるディルドリン残留分析の有効性について検討したので報告する。

なお、本研究の遂行にあたりまして貴重な御意見、御助言を賜りましたJA全農東京支所の住田明子氏に厚く御礼申し上げます。

¹ Address : Tokyo Metropolitan Agricultural Experiment Station, 3-8-1 Fujimi-cho, Tachikawa, Tokyo 190-0013, Japan
2003年4月23日受領

材料および方法

1. 試薬および機器

1) 試料抽出

アセトン, ヘキサン, ジエチルエーテルおよびメタノール: 和光純薬, 残留農薬試験用300。ケイソウ土カラム: メルク社, エキストレルートNT20。固相抽出用カラム: パリアン社, メガボンドエリートフロリジルPR, 充填量5g/20ml。濾紙: アドバンテック社, No.6濾紙。セライト: 和光純薬, No.545。

2) ガスクロマトグラフィー質量分析

ガスクロマトグラフィー質量分析計: ヒューレットパカード社, HP 6890 GCシステムおよびHP 5973質量選択検出器。カラム: ヒューレットパカード社, HP-1MS, 内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m。カラム温度: 初期温度100 で2分保持, 10 /分で300まで昇温。注入口温度: 280。検出器温度: 300。注入量: 1 μ l, スプリットレス。ガス流量: He, 1ml/分。

3) ガスクロマトグラフィー分析

ECD検出器付きガスクロマトグラフィー: 島津製作所, GC-14。カラム: J&W社, DB-17, 内径0.32mm, 長さ30m, 膜厚0.5 μ m。カラム温度: 初期温度100で2分保持, 5 /分で300まで昇温, 3分保持。注入口温度: 280。検出器温度: 300。注入量: 2 μ l, スプリットレス。ガス流量: He, 3ml/分。

4) イムノアッセイ

残留農薬測定キット: SDI社, シクロジエン系(ドリン類)測定キット。チューブラック: SDI社, マグネトラック60チューブ用。吸光度計: セティカンパニー, ハンディフォトメーターModel-6(フィルター450nmおよび角型セル用ホルダーを付属品として使用)。

2. ガスクロマトグラフ法による分析

1) 試料の採取および調整

土壌(腐植質黒ボク土)およびキュウリ果実は東京都内の農地から、「農薬の登録申請に係る試験成績について」(12農産第8147号農林水産省農産園芸局長通知)に従って採取した。土壌は2mmのふるいにかけたものを, キュウリ果実はぶつ切りにしたものをそのまま調理用ミキサー(ナショナル電気ミキサーMX-S3)を用いて磨砕均一化して分析に供した。

2) 分析方法

土壌は乾燥重量5gに相当する量を, キュウリ果実

は磨砕液20gを分析に用いた。土壌およびキュウリ磨砕液に100mlのアセトンを加え室温で30分振とう抽出した後に土壌抽出液は濾紙で濾過し, キュウリ抽出液はセライトを用いて吸引濾過した。濾液は濃縮し, 蒸留水を加えて液量が20mlとなるようにした。それをケイソウ土カラムに流し15分放置してから100mlのヘキサンで溶出した。溶出液の溶媒を留去し, 5mlのヘキサンに溶解した液を固相抽出カラムに流し, 50mlのヘキサン: ジエチルエーテル(85:15)混合液で溶出した。溶出液の溶媒を留去し, 2mlのヘキサンに溶解したものをガスクロマトグラフィー質量分析計で定性し, ECD検出器付きガスクロマトグラフィーで定量した。

3) 添加回収試験

添加回収試験には, あらかじめ上述の方法で分析し, デイルドリンが含まれていないことを確認した土壌およびキュウリ磨砕液を使用した。

乾燥重量5gに相当する土壌もしくは20gのキュウリ磨砕液にデイルドリン標準品(和光純薬, 残留農薬試験用)を1 μ g/mlの添加濃度になるように添加し, 上述の方法で分析を行い, 回収率を求めた。

3. イムノアッセイ法による分析

1) 試料の調整

ガスクロマトグラフ法による分析の結果, デイルドリンが検出された土壌およびキュウリ磨砕液を選び, イムノアッセイに供した。

検量線の作成および添加回収試験のための試料はガスクロマトグラフ法による分析の結果, 本研究で用いたイムノアッセイキットでデイルドリンおよびデイルドリンと同様に抗体と反応する農薬(以後, 交叉反応物質と呼ぶ)を含んでいないことが確認された土壌およびキュウリ磨砕液を用いた。

2) 分析方法

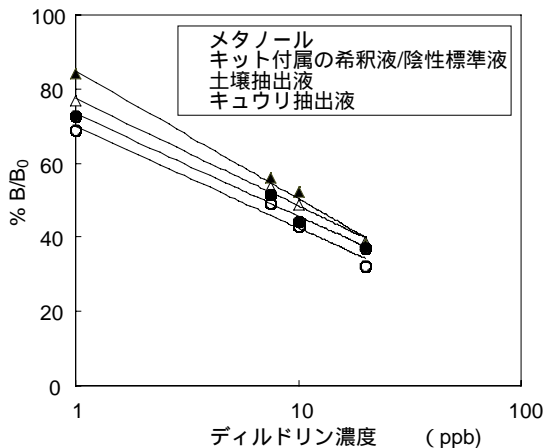
土壌は乾燥重量10gに相当する量に, キュウリ磨砕液は10gに20mlのメタノールを加えて室温で30分振とう抽出して濾過した後, シクロジエン系(ドリン類)測定キット付属の希釈液/陰性標準液を加えて25倍に希釈した。希釈した液240 μ lに10 μ lのキット付属の希釈液/陰性標準液を加えて250 μ lとした液を試料としてキット付属のプロトコールに従ってイムノアッセイに供し, 吸光度(B値)を測定した。キット付属の希釈液/陰性標準液250 μ lを同様にイムノアッセイに供し, 吸光度(B₀値)を測定した。測定したB値をB₀値で除

して100をかけた値(% B/ B₀値)をグラフにプロットしてディルドリンの濃度を求めた。すべてのキット付属の試薬と上述の方法で抽出した試料は室温状態にし、イムノアッセイは室温(約23℃)で行った。検量線作成用の試料として240 μlのキット付属の抗原標準水溶液(1, 7.5, 20ppbの3種類の濃度の抗原標準水溶液が付属されている)に10 μlのキット付属の希釈液/陰性標準液を加えて250 μlとした液をイムノアッセイに供し、吸光度を測定した。メタノール、土壌抽出液およびキュウリ抽出液のイムノアッセイに及ぼす影響を調べるために、240 μlのキット付属の抗原標準水溶液にメタノール、ディルドリンと交叉反応物質が含まれていない土壌抽出液あるいはキュウリ抽出液を、それぞれ10 μl加えて250 μlとした液をイムノアッセイに供し、吸光度を測定した。

3) 添加回収試験

ディルドリンと交叉反応物質が含まれていない乾燥重量10gに相当する土壌あるいは10gのキュウリ磨砕液にディルドリン標準品を0.2ppmの添加濃度になるように添加し、上述の方法でイムノアッセイを行い、回収率を求めた。

結果および考察



第1図 イムノアッセイ法による検量線

メタノールはディルドリンの抽出に適し(Wheeler, 1982), イムノアッセイに対する妨害が少ないことから(Azza, 1993), 本研究のイムノアッセイのための抽出溶媒としてメタノールを選択した。メタノール、土壌の抽出液あるいはキュウリ磨砕液の抽出液を加えて作成した検量線は希釈液/陰性標準液を加えて作成した検量線とは異った(第1図)。Williams (1996)はオレンジ中の2,4-D分析について、Azza (1993)は乳製品中のディルドリン分析について、本研究と同様に検量線がシフトすることを報告している。したがって、本研究においても抗原標準水溶液に土壌の抽出液あるいはキュウリ磨砕液の抽出液を加えてイムノアッセイを行い、検量線を作成した。

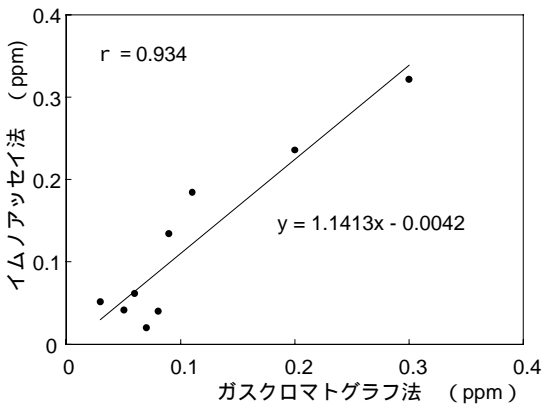
土壌およびキュウリ試料のガスクロマトグラフ法で分析した場合の回収率(1ppm添加)は、土壌とキュウリでそれぞれ77%, 82%であった。一方、イムノアッセイ法の検量線はキット付属の抗原標準水溶液を用いて作成するために、その濃度範囲が低い範囲に限られることから、添加濃度はイムノアッセイで得られる測定結果がキット付属の抗原標準水溶液を用いて作成した検量線の範囲に入るように0.2ppmにし、ガスクロマトグラフ法とは異なる添加濃度で回収率を求めた。イムノアッセイを用いた場合の回収率も土壌とキュウリで、それぞれ、96%, 77%と良好であった(第1表)。

土壌については0.08から0.3ppmの範囲でガスクロマトグラフ法による分析値とイムノアッセイ法による分析値がほぼ同様の値を示し、両者の間に高い相関が認められたが0.08ppmより低い範囲では相関が認められなかった(第2図)。キュウリについては0.01から0.05ppmの範囲でガスクロマトグラフ法による分析値とイムノアッセイ法による分析値を比較した結果、相関は認められたものの、イムノアッセイ法による分析値がガスクロマトグラフ法による分析値よりすべて高くなり、分析値のばらつきも大きかった(第3図)。本研究ではイムノアッセイのための試料抽出を簡便に

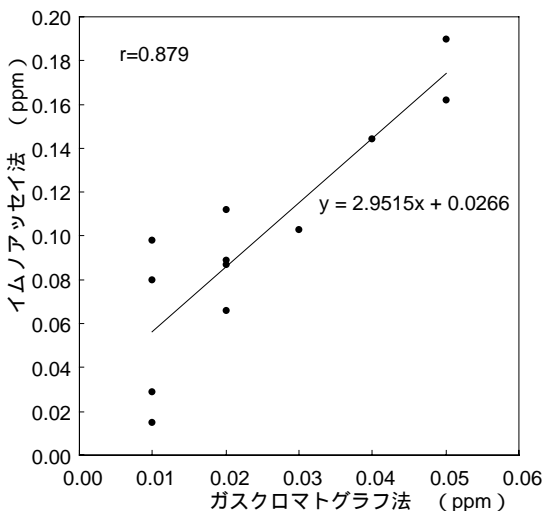
第1表 オトギリソウ属(Hypericum)植物に対するセイヨウキンシバイさび病菌夏胞子の接種結果

分析法	土 壌			キュウリ		
	供試量 (g)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)	供試量 (g)	添加濃度 (ppm)	回収率 (%)
ガスクロマトグラフ法	5	1	77	20	1	82
イムノアッセイ法	10	0.2	96	10	0.2	77

するために濃縮操作をしなかったが、低濃度の範囲でイムノアッセイ法による分析値を精度よく出すためには濃縮操作が必要である。しかし、作物試料や水試料をイムノアッセイに供したときに機器分析と比較して分析値が高くなる現象が、オレンジに残留する2,4-D (Williams, 1996) や水試料中のTPN (Takahashi, 1999) でも認められ、試料中の夾雑物がイムノアッセ



第2図 土壌試料におけるガスクロマトグラフ法とイムノアッセイ法による分析結果の比較



第3図 キュウリ試料におけるガスクロマトグラフ法とイムノアッセイ法による分析結果の比較

イに影響を及ぼすことが示唆されている。したがって、試料を濃縮する場合には、さらに夾雑物の影響が大きくなると予想されるので、夾雑物を取り除くための精製操作を検討することも、あわせて必要になる。

東京都が行った土壌調査では、ディルドリンが検出された検体のうち残留値が0.08ppm以上の土壌はほぼ半数であり、残る半数は0.08ppm未満であったことからイムノアッセイ法でスクリーニングをした場合に正しく検出できるのは残留土壌の約5割ということになる。また、キュウリ果実の実態調査結果からは、ディルドリンが検出された果実の多くが0.05ppm以下であり、残留基準値(キュウリ: 0.02ppm)付近の分析値を把握することが重要であることから、スクリーニング法としてイムノアッセイ法を適用するためには低濃度の残留値を精度よく分析できるように試料の濃縮方法と精製方法について検討する必要が生じる。イムノアッセイ法は生産現場に近い場所で、簡易に、かつ短時間に分析結果をだせることが大きな利点であるので、濃縮方法と精製方法を検討する際にはこの利点を生かせるよう、できるだけ簡便な方法を検討することが望ましい。

引用文献

- Azza, M. A. et al. (1993) Food & Agricultural Immunology 5 : 145 - 154.
- Azza, M. A. et al. (1994) Food & Agricultural Immunology 6 : 31 - 38
- Jorgenson, J.L. (2001) Environmental Health Perspectives 109 (1): 113 - 139.
- Kaufman, B. M. and M. Clower, Jr (1995) Journal of AOAC International 78 (4): 1079 - 1090.
- 四国地域技術連絡会議 (1973) 四国農業の技術情報 5 : 2 - 12.
- 高橋義行ら (1995) 関東病虫研報 42 : 297 - 299.
- Takahashi Y. et al. (1999) J. Pesticide Sci. 24 : 255 - 261.
- Williams, K. J. et al. (1996) Intern. J. Environ. Anal. Chem. 65 : 149 - 152.
- Wheeler W. B. et al. (1982) J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. 65 (5) : 1112 - 1117.
- 湯浅洋二郎 (1998) 食衛誌 39 (2) : 61 - 66.