

## 簡易キットによる有機リン系農薬の迅速検査法の検討

上條 恭子, 小林 麻紀, 大塚 健治, 田村 康宏, 富澤 早苗, 岩越 景子,  
佐藤 千鶴子, 井部 明広, 永山 敏廣, 高野 伊知郎

### **Rapid Detection of Organophosphorus Pesticide with Simple Test Kits**

Kyoko KAMIJO, Maki KOBAYASHI, Kenji OTSUKA, Yasuhiro TAMURA, Sanae TOMIZAWA,  
Keiko IWAKOSHI, Chizuko SATO, Akihiro IBE, Toshihiro NAGAYAMA and Ichiro TAKANO

## 簡易キットによる有機リン系農薬の迅速検査法の検討

上條 恭子<sup>a</sup>, 小林 麻紀<sup>a</sup>, 大塚 健治<sup>a</sup>, 田村 康宏<sup>a</sup>, 富澤 早苗<sup>a</sup>, 岩越 景子<sup>a</sup>,  
佐藤 千鶴子<sup>a</sup>, 井部 明広<sup>b,c</sup>, 永山 敏廣<sup>d</sup>, 高野 伊知郎<sup>a</sup>

食品に起因する健康危害発生時に速やかな原因の特定に役立てるため、農薬混入事件で話題になったメタミドホスやジクロロボス、毒性の高いトリアゾホスを対象に、3種類の農薬分析簡易キット（アグリスクリーンチケット、アグリケム<sup>TM</sup>、有機りん系農薬検出キット）による迅速検査法を検討した。有機りん系農薬検出キットでは3農薬とも検出されたが、他の2種のキットにおいてはメタミドホスは高濃度でも検出されなかった。厚労省通知の迅速試験法に準じて調製した試験液は、有機りん系農薬検出キットではそのまま測定できたが、他のキットでは試験液を水に置換する必要があった。アグリケム<sup>TM</sup>では油脂の影響を受けずに正確な判定が可能であったが、有機りん系農薬検出キットでは固相カラムによる油脂の除去が必要であった。アグリスクリーンチケットにおいては油脂の除去を行っても農薬の有無の判定ができなかった。色素の妨害については、試験液を水に置換することにより、3キットいずれも正確な判定が可能であった。以上から、試料の状態に応じてキットを使い分けることにより、3農薬の迅速検査が可能であることが判明した。

**キーワード：**簡易キット、有機リン系農薬、迅速検査、メタミドホス、ジクロロボス、トリアゾホス、油、色素

### はじめに

2007年から2008年にかけて中国産冷凍ぎょうざにおけるメタミドホスの混入や、中国産冷凍いんげんにおけるジクロロボスの混入など国民の健康を害するような事例が相次いで発生した。このような食品に起因する健康危害発生時には的確な治療、被害拡大防止、健康危害の未然防止に役立てるため速やかに原因を特定することが重要である。農薬の測定には現在GC/MSやLS/MSなどの分析機器が主に使用されているが、これら機器分析は抽出などの操作に時間がかかる上、高価である。そこで、今回機器分析に先んじてコリンエステラーゼ活性阻害や化学反応を利用した簡易キットを用い、迅速に農薬の有無及びおおよその濃度の予測が可能であるか検討することとした。対象農薬には、メタミドホス、ジクロロボスに加え毒性の高いトリアゾホスを選択した。

### 実験方法

#### 1. 試薬

標準品：メタミドホス、ジクロロボス及びトリアゾホスはいずれも和光純薬工業（株）及び林純薬工業（株）製の残留農薬試験用を用いた。

メタノール：和光純薬工業（株）製の残留農薬試験用を

用いた。

水：精製水を ELIX5-Milli-Q 超純水装置（日本ミリポア（株）製）により精製して用いた（比抵抗値 18 MΩ・cm 以上）。

固相カラム：GL Sciences 社製 Inert Sep<sup>®</sup>C18 1 g/6 mL, SUPELCO 社製 ENVICARB- II /PSA 500/300 mg 6 mL を用いた。

#### 2. 試料

油：あらかじめ農薬が残留していないことを確認したオリーブオイルを用いた。

緑色野菜：あらかじめ農薬が残留していないことを確認した国内産ほうれんそうを用いた。

#### 3. 測定キット

##### 1) アグリスクリーンチケット（以下、ATと略す）

NEOGEN CORPORATION社製（コリンエステラーゼ阻害反応）：殺虫剤チケット(Pesticide Detector Tickets), アクチベーターアンプル(Activator Ampules), 50 mL ビーカー及びガラス棒。

##### 2) 残留農薬検出キットアグリケム<sup>TM</sup>（以下、ACと略す）

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部（当時）

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>c</sup> 現所属：実践女子大学

191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1

<sup>d</sup> 東京都健康安全研究センター食品化学部

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

(株) マイクロ化学技研製 (コリンエステラーゼ阻害反応) : アグリケム本体, 1液, チューブ2 (2液), チューブ3, 3液, 4液, 蒸留水, カラムチップ, シリンジ (10 mL), ろ過パック, チューブラック及び色インデックスカード.

### 3) 有機りん系農薬検出キット (以下, PKと略す)

(株) 関東化学製 (化学反応) : 4-(4-ニトロベンジル) ピリジン (NBP) 試薬入り試験管, テトラエチレンペントアミン (TEP) 試薬及び抽出溶媒(3-ペンタノン).

## 4. 機器

恒温槽 : (株) 前田製作所製

紫外可視分光光度計 : (株) 島津製作所製UV-1800

## 5. 標準溶液の調製

メタミドホス及びジクロロホスについては標準品10 mgを水に溶解して正確に100 mLとして100 µg/mL標準原液を調製した. トリアゾホスについては標準品10 mgを10 mLのメタノールで溶解した後, 水で正確に100 mLとして100 µg/mL標準原液を調製した. 用時, 標準原液を量り採り, 水を加えて0.1, 1, 10 µg/mLの各標準溶液を調製した.

## 6. 試験液の調製

### 1) 水抽出試験液

各キットに添付されている説明書に従い, 水抽出にて調製したものを試験液Iとした.

### 2) 有機溶媒抽出試験液

厚生労働省事務連絡「食品中に残留する有機りん系農薬に係る試験法について」<sup>1)</sup> (以下迅速分析法と記載) に示してある試験法に準じて試験液を調製した. すなわち均一化した試料10.0 gを量り採り, 酢酸エチル75 mL及び無水硫酸ナトリウム75 gを加え, 5分間細砕した後, 吸引ろ過した. 次いで, ろ紙上の残留物を酢酸エチルで洗いながら正確に200 mLに定容し, 試験液IIとした.

## 7. 測定方法

各キットに添付されている説明書に従い, 試験液が水抽出液である場合の測定法と有機溶媒抽出液である場合の測定法についてそれぞれ行った.

### 1) AT

#### (1) 水抽出検査法

①試験液I 20 mLをビーカーに採った. ②アクチベーターアンプルを標準溶液の入ったビーカーに入れ, ガラス棒でアンプルを割って混合し3分間放置した. ③殺虫剤検出用チケットのカバーホイルを酵素側のみをはがし, この部分を1分以上前述②の混合溶液中につけた. ④ビーカーから殺虫剤検出用チケットを取り出して基質側のホイルをはがし, チケットを折り曲げ, 2つのディスク面を重ね合わせて3分間保持した. ⑤殺虫剤検出用チケットを開き酵素ディスクの呈色 (青色) を観察した.

②) 有機溶媒抽出検査法 ①試験液II 50 µLを酵素ディスクに滴下しドライヤーで溶媒を完全に蒸発させた. ②ビ

ーカー内でアクチベーターアンプルを割り, 水1 mLを加えて混ぜた. ③希釈したアクチベーターを50 µL酵素ディスクに滴下して3分間放置した. ④チケットのホイルを取り除き, 2つのディスクが合わさるようにチケットを折り曲げ, 3分間保持した. ⑤チケットを開き, 酵素ディスクの呈色を観察した.

### 2) AC

(1) 水抽出検査法 ①チューブ2に蒸留水1 mL加え, 内容物を完全に溶解して2液を調製した. ②10 mLシリンジの先端にカラムチップを取り付け, カラムシリンジを作製した. ③アグリケム本体に1液を1滴添加した. ④試験液I 10 mLをカラムシリンジを用いて吸引しビーカーに排出した. さらに, 排出・吸引を3回繰り返し, カラムに農薬を吸着させた. ⑤2液をカラムシリンジで吸引・排出し, カラムに吸着された農薬を活性化させた. ⑥3液をチューブ3に3滴入れ, カラムシリンジで3回吸引・排出を繰り返してカラム内の農薬を3液に溶出させた. ⑦3液をカラムシリンジで吸引し, アグリケム本体に排出した後, アグリケム本体を軽く振って攪拌し, 15分間放置した. ⑧4液をアグリケム本体に1滴加え, 15分間放置した. ⑨アグリケム本体の上層部の青色の呈色を観察し, 色インデックスの色と比較した.

(2) 有機溶媒抽出検査法 ①アグリケム本体に1液を1滴添加した. ②試験液II 200 µLを添加した (コントロールには蒸留水200 µLを添加した). ③アグリケム本体のふたを閉めた後軽く振って攪拌し, 15分間放置した. ④4液を③に1滴添加し, ふたを閉めた後軽く振って攪拌し, 15分間放置した. ⑥アグリケム本体上層部の呈色の色インデックスカードの色と比較した.

### 3) PK

(1) 水抽出検査法 ①試験液I 1 mLをNBP試薬入り試験管に採った. ②100°Cの温浴で20分間加熱した. ③攪拌後, 室温まで放冷した. ④TEP試薬を2滴加え激しく攪拌した. ⑤抽出溶媒を1 mL加え試験管のキャップを閉めた後, 転倒混和した. ⑥静置して3分以内に上層の呈色 (赤~赤紫色) を目視にて観察及び紫外可視分光光度計 (556 nm) にて測定した.

(2) 有機溶媒抽出検査法 ①試験液II 1 mLをNBP試薬入り試験管に採った. ②100°Cの温浴で20分間加熱した. ③加熱後水を1 mL添加し攪拌後, 室温まで放冷した. ④TEP試薬を2滴加え激しく攪拌した. ⑤抽出溶媒を1 mL加え試験管のキャップを閉めた後, 転倒混和した. ⑥静置して3分以内に上層の呈色を目視にて観察及び紫外可視分光光度計にて測定した.

## 結果及び考察

### 1. 検査に要する時間

各キットにおける検査の所要時間を測定したところ, 1検体あたりATでは約10分, ACでは約40分, PKでは約50分かかった. なお, ACとPKについては同時に多数の検体を

測定することができた。

## 2. 検出限界の検討

健康危害の未然防止のために必要な検出限界については、メタミドホスのLD<sub>50</sub>値13 mg/kg (ラット, 経口)<sup>2)</sup>を参考に最小定量濃度を導いた。体重20 kgの小児が200 g喫食した場合, 約1000 µg/mLがLD<sub>50</sub>値に相当することになる。これを基準に1/10000倍量, 1/1000倍量, 1/100倍量, 及び1/10倍量である0.1, 1, 10, 100 µg/mLの各標準水溶液を調製し, 各キットにおけるジクロロボス, メタミドホス及びトリアゾホスの検出限界を求めた。その結果は以下の通りであった (表1)。

表1. 各キットにおける農薬の検出限界

	(µg/mL)		
	アグリスクリー ンチケット (AT)	アグリケム™ (AC)	有機リン系農 薬検出キット (PK)
ジクロロボス	10	10	1
メタミドホス	(-)	(-)	100
トリアゾホス	1	0.1	10

(-) : 検出不能 (> 100 µg/mL)

### 1) ジクロロボス

AT 及び AC では 10 µg/mL 以上, PK では 1 µg/mL 以上の濃度で検出された。

なお, キット付属の説明書による検出限界と比較したところ, AT 及び PK は実験結果と同じ検出限界であったが, AC では説明書の検出限界は 0.04 µg/mL であり, 実験結果の 10 µg/mL と大きな差が見られた。

### 2) メタミドホス

PK では 100 µg/mL 以上の濃度で検出されたが, AT 及び AC では 100 µg/mL でも検出されなかった。キット付属の説明書には AT での検出限界は食品中 10~100 µg/mL と記載されているが, 他の2つのキットではメタミドホスの検出限界は記載されていない。AT 及び AC では健康危機発生時に感度が不十分で活用できない可能性がある。

### 3) トリアゾホス

AT では 1 µg/mL, AC では 0.1 µg/mL, PK では 10 µg/mL 以上の濃度で検出された。

キット付属の説明書には各キットとも検出限界は記載されていなかった。

## 3. 有機溶媒抽出液での検討

簡易キットにはコリンエステラーゼ活性阻害を利用したものが多く, これは主に水抽出液での検査を前提としているが, 一部に有機溶媒抽出液での検査法も説明がある。一方, 迅速分析法は酢酸エチル溶液を試験液としている。そこで, 各キットでの測定において酢酸エチル抽出溶液が使用できるか検討した。試験液は標準水溶液による検査結果から得られた検出限界以上の濃度のジクロロボスを添加し

た酢酸エチル溶液 (AT 10 µg/mL, AC 10 µg/mL, PK 1 µg/mL) とジクロロボス無添加の酢酸エチルを用いた (表2)。

表2. 各キットにおける酢酸エチルの影響

酢酸エチル 溶液	アグリスクリー ンチケット (AT)	アグリケム™ (AC)	有機リン系農 薬検出キット (PK)
ジクロロボス 添加	陽性 (10)*	陽性 (10)*	陽性 (1)*
無添加	偽陽性	偽陽性	陰性

\* ( ) 内は添加濃度(µg/mL)を示す。

### 1) AT

有機溶媒抽出検査法を用いた。試験液の量が少ないと正確な検査結果が得られない可能性があるが, 酵素ディスクの面積が狭いため, 試験液がはみ出さないよう添加量を 50 µL とした。また, ドライヤーで試験液を蒸発させる際, 温風と冷風では結果に差はなかったため, 温風にて短時間で溶媒を蒸発させた。以上の条件で検討したところ, ジクロロボス 10 µg/mL を検出できたが, 農薬無添加の酢酸エチル溶液では偽陽性を呈した。なお, キット付属の説明書では測定可能とされていたヘキササン溶液で検討したところ, ジクロロボス 10 µg/mL を検出できたが, 農薬無添加のヘキササン溶液でも偽陽性の結果が出た。

### 2) AC

有機溶媒抽出検査法にて検査を行ったところ, ジクロロボス 10 µg/mL を検出できたが, 農薬無添加の酢酸エチル溶液でも偽陽性を呈した。

### 3) PK

酢酸エチル溶液の試験液 1 mL を添加したところ, 100°C の温浴の加熱で酢酸エチル全量が蒸発したため, 加熱後に水 1 mL を添加して検討を続けた。その結果, 農薬添加の場合は陽性となり, 無添加の場合の疑陽性も認められず, 正確な結果を得ることができた。

他のキットにおいては直接酢酸エチル溶液の試験液を添加した時点で酵素ディスクや固相コリンエステラーゼが影響を受け, その後酢酸エチルを蒸発させても正確に測定ができなかった。一方, PK においては酢酸エチル溶液の試験液を直接添加しても正確に測定及び判定することができた。

## 4. 精製法の検討

迅速分析法は抽出操作が簡便であるため, 食品によっては抽出液が油脂及び色素を含み, 機器分析において妨害となることがある。簡易キットにおいて油脂及び色素の存在下での検査が可能であるか, また, 固相カラムを用いての油脂及び色素の除去の有効性について検討した。

### 1) 油脂の影響

油脂の含まれている食品として惣菜などの加工食品を想定した。日本食品標準成分表<sup>3)</sup>によると加工品中の脂質はぎょうざ8.1 g/100 g, コロッケ (クリームタイプ) 6.3 g/100 g及びハンバーグ13.4 g/100 g (以上全て冷凍食品) であることから, 加工品中の脂質を10%と想定した。加工品の脂質がすべて抽出液に移行したとすると, 迅速分析法抽出による試験液は20倍希釈となることから, およそ0.5%の油分を含むと考えられる。そこで, 油脂のみの影響を観察するために, 0.5%油・水溶液を調製し, 検討した (表3)。

表3. 各キットにおける油脂の影響

		アグリスクリー ンチケット (AT)	アグリケム™ (AC)	有機リン系農 薬検出キット (PK)
0.5% 油・水溶液	ジクロロボス 添加*	偽陰性	陽性	偽陰性
	農薬無添加	陰性	陰性	陰性
C18精製	ジクロロボス 添加*	偽陰性～陽性	陽性	陽性
	農薬無添加	陰性	陰性	陰性
ENVICARB-II /PSA	ジクロロボス 添加*	判定不能	陽性	陽性
	農薬無添加	陰性	陰性	陰性

\* 添加濃度は表2に同じ。

はじめに, 有機溶媒抽出液での検討と同様に検出限界以上のジクロロボス (AT 10 µg/mL, AC 10 µg/mL, PK 1 µg/mL) を添加した 0.5%油・水溶液を激しく混和し各キットに添加して油脂の影響を検討した。AC では陽性を呈し, 油脂の影響を受けないことが確認された。一方, AT 及び PK では偽陰性を呈し, 油脂による測定への影響が認められた。そこで, 油脂の影響を除去するため C18 と ENVICARB-II /PSA の2つの固相カラムによる精製効果について検討した。

C18 による精製は, あらかじめアセトン 20 mL でカラムをコンディショニングした後, 0.5%油・酢酸エチル試験液を 1 mL 負荷した。これをアセトン 20 mL で溶出した後, 濃縮乾固し, 水で 1 mL に定容した。ENVICARB-II /PSA による精製は, トルエン・アセトニトリル (1:3) 混液 20 mL でカラムをコンディショニングした後, 0.5%油・酢酸エチル試験液を 1 mL 負荷した。これをトルエン・アセトニトリル (1:3) 混液 30 mL で溶出した後, 濃縮乾固し, 水で 1 mL に定容した。

PKではいずれの固相カラムを用いてもジクロロボスが添加されている試験液では陽性, 添加されていない試験液は陰性を呈し, 固相カラム精製によって油脂が除去され, 正確な判定が可能になることが確認された。なお, ATでは精製操作を行っても明確な判定はできなかった。

## 2) 色素の影響

ほうれんそうを用いて色素を含む食品への適用を検討した。

迅速分析法により調製したほうれんそう試験液に検出限界レベルのジクロロボスを添加したものと, 無添加のものをを用いた。ただし, 色素のみの影響を見るため, 酢酸エチルを除去し水に置換して試験を行った。

いずれのキットでも色素の影響を受けずに測定することが可能であった。これは有機溶媒に溶けていた緑色色素が水に移行しなかったためと考えられた。なお, PK は有機溶媒溶液でも測定可能であったが, ほうれんそう試験液 (酢酸エチル溶液) を直接 PK に負荷した場合は, 色素の影響を受け呈色の判別が難しく測定が困難であった。

## ま と め

3種類の農薬分析簡易キットによる有機リン系農薬の迅速検査の可能性について比較検討した。

各キットにおける農薬の検出限界は, AT では, ジクロロボス 10 µg/mL 及びトリアゾホス 1 µg/mL であり, メタミドホスでは 100 µg/mL でも検出されなかった。AC では, ジクロロボス 10 µg/mL 及びトリアゾホス 0.1 µg/mL であり, メタミドホスでは 100 µg/mL でも検出されなかった。PK では, ジクロロボス 1 µg/mL, トリアゾホス 10 µg/mL 及びメタミドホス 100 µg/mL であった。

各キットにおける 1 検体あたりの検査の所要時間は AT では約 10 分, AC では約 40 分, PK では約 50 分ほどであった。

通知迅速分析法においては, PK のみが直接試験液を用いて迅速に測定することができたが, 他のキットでは試験液を酢酸エチルから水に置換する必要がある。

油脂の妨害については, AC は油脂の影響を受けずに正確に判定することができた。PK においては固相カラムで精製した後, 正確な判定が可能になった。しかし, AT においては精製操作を行っても明確な判定はできなかった。

色素等の妨害は, 試験液中の酢酸エチルを水置換することにより除去できた。

以上より, ジクロロボス及びトリアゾホスの測定において, 簡便に結果を得たい場合は AT を用い, 油脂及び色素が含まれている場合には, 迅速試験法の試験液を水置換し, AC により測定すると良いと考えられた。メタミドホスの測定においては, 油脂を含む食品では精製操作が必要だが, PK を用いた方が良いと考えられた。また, 酢酸エチル抽出液を直接用いる時は, 油脂及び色素の妨害がない食品であれば, 今回検討した 3 種類の農薬すべてを測定できる PK で迅速かつ簡便に検査できることがわかった。

## 文 献

- 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課: 食品中に残留する有機リン系農薬に係る試験法について, 平成 20 年 3 月 7 日。
- Tomlin, C D S and British Crop Protection Council: *The Pesticide Manual*, 14th ed., 691-692, 2006, British Crop Protection Council Alton, UK.

- 3) 文部科学省：五訂増補日本食品標準成分表, 242, 2005,  
国立印刷局, 東京.

### Rapid Detection of Organophosphorus Pesticide with Simple Test Kits

Kyoko KAMIJO<sup>a</sup>, Maki KOBAYASHI<sup>a</sup>, Kenji OTSUKA<sup>a</sup>, Yasuhiro TAMURA<sup>a</sup>, Sanae TOMIZAWA<sup>a</sup>,  
Keiko IWAKOSHI<sup>a</sup>, Chizuko SATO<sup>a</sup>, Akihiro IBE<sup>b,c</sup>, Toshihiro NAGAYAMA<sup>a</sup> and Ichiro TAKANO<sup>a</sup>

Pesticide analyses kits are thought to be effective for urgent inspection. We compared the performance of 3 kinds of commercially available kits: Agriscreen Ticket (AT), AgriChem<sup>TM</sup> (AC), Organophosphorus pesticide detection kit (PK) with 3 kinds of pesticides (Methamidophos, Dichlorvos, and Triazophos). Regarding the time required to complete the test, the AT kit which was completed in 10 minutes, was the best. For detection, the PK kit, which could detect Methamidophos, was the best. AT and AC were not able to detect Methamidophos even at high concentrations (>100 ppm). Pigment did not influence measurement with all kits when they used water as the extraction solvent as pigment was not able to extract the pigments with water. AC was able to detect a pesticide without being affected by oils. PK was able to detect pesticides after solid phase extraction (SPE) of the oil, but AT was not able to detect pesticides, even after SPE. From these results, we conclude that is best to choose these kits depending on the materials to be tested.

**Keywords:** simple test kit, organophosphorus pesticide, rapid detection, methamidophos, dichlorvos, triazophos, oil, pigment

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>b</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, at the time when this work was carried out,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

<sup>c</sup> Present Address: Jissen Women's University,  
4-1-1, Osakaue, Hino-shi, Tokyo 191-8510, Japan