

コリンエステラーゼ活性阻害を利用した簡易キットによる農薬の分析

上 條 恭 子*, 高 野 伊知郎*, 小 林 麻 紀*, 田 村 康 宏*, 富 澤 早 苗*,
立 石 恭 也*, 酒 井 奈穂子*, 永 山 敏 廣**, 井 部 明 広*,

Analysis of Pesticides by a Simplified Kit Based on Inhibition of Cholinesterase Activity

Kyoko KAMIJO*, Ichiro TAKANO*, Maki KOBAYASHI*, Yasuhiro TAMURA*, Sanae TOMIZAWA*,
Yukinari TATEISHI*, Naoko SAKAI*, Toshihiro NAGAYAMA** and Akihiro IBE*

We studied the quality and quantity of organophosphorus pesticides and carbamate pesticides using a cholinesterase inhibition activity kit. The strength of inhibition was detected from variations in the color of the kit, and the strength of color was determined by a densitometer (absorbance at 650 nm). This enabled quantitative analysis of each pesticide within a narrow range. These pesticides had their own ranges of response to the enzyme activity inhibition kit. The responses of chlorpyrifos and malathion were observed above 0.2 µg/mL, and those of carbaryl and methomyl were observed above 5 µg/mL.

We applied this method to compare the inhibition of cholinesterase activity of organophosphorus pesticides and carbamate pesticides. The total response of inhibition when several pesticides were mixed almost corresponded to the strength of each pesticide response put together.

Keywords : 阻害 inhibition, 簡易キット simple kit, コリンエステラーゼ cholinesterase, 有機リン系農薬 organophosphorus pesticide, カルバメート系農薬 carbamate pesticide, デンシトメーター densitometer

緒 言

一般に残留農薬分析は操作が煩雑であり、高価な分析機器を必要とする。また、多量の有機溶媒を使用することから、分析担当者の健康及び環境への負荷が懸念され、これらの解決が課題となっている。

一方、コリンエステラーゼ（以下、ChE）阻害反応を利用した簡易測定キットは、酵素活性阻害の程度を試験紙の呈色反応として捉えることによって短時間のうちに有機リン系及びカルバメート系農薬の存在を把握することができる。また、用いる有機溶媒も少量であることから、農作物の生産現場で汎用されているとともに今後の農薬分析への応用が期待されている。

そこで、今回、代表的な有機リン系及びカルバメート系農薬を用いて本キットの定性及び定量性について検討した。また、併せて複数の農薬を混合した場合の相加作用、相乗作用についても検討した。

実 験 方 法

1. 試薬

標準品

有機リン系農薬及び代謝物：クロルピリホス、クロルピ

リホスオキシソン、マラチオン、マラオクソン、

カルバメート系農薬：カルバリル、メソミル

その他の農薬：イマザリル、プロシミドン

いずれも和光純薬工業（株）および林純薬工業（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）。

2. コリンエステラーゼ阻害反応キット

Neogen 社製の AT-10 を用いた。本キットは基質ディスクと酵素ディスクの貼り付けられている殺虫剤検出用キット、アクチベーターアンプル、50 mL ビーカー、ガラス棒から構成される。

3. 装置

デンシトメーター：（株）島津製作所製フライングスポットスキャナーCS9000 を用いた。

* 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

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター多摩支所理化学研究科

4. 標準溶液の調製

各農薬及び代謝物の標準品 50 mg をアセトンに溶かして正確に 50 mL として 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 標準原液を作製した。クロルピリホス及びマラチオンについてはそれぞれ標準原液 1 mL をとり、アセトンを加えて正確に 50 mL として、各々 20 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を作製した。その他の農薬についてはそれぞれ標準原液 10 mL をとり、同様に操作して各々 200 $\mu\text{g/mL}$ の標準溶液を作製した。

5. 検量線作成用標準溶液および混合標準溶液の調製

用時、標準溶液あるいは標準原液の適量を量り採り、窒素気流下でアセトンを揮散させた後メタノール 10 mL に溶解し、水を加えて正確に 100 mL として 0.1~40 $\mu\text{g/mL}$ 検量線作成用標準溶液及び混合標準溶液を作製した。

6. コリンエステラーゼ阻害反応キットの操作及び定性、目視による検出限界

キットに添付されているマニュアルに従った。

①標準溶液 20 mL をビーカーにとった。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。

同時に検量線作成用標準溶液についても同様に操作し、呈色の様子を比較して、目視による農薬の検出限界を求めた。

7. デンシトメーターによる検量線の作成及び定量

呈色した酵素ディスクを切り取り白紙上に貼り付けた後、デンシトメーターを用いて測定した。本酵素ディスクの大きさ（直径 10 mm）に合わせ、測定用スリットを 1.0 mm \times 16 mm に調整し、測定波長 650 nm で各々の酵素ディスクをスキャンさせながら吸光度を測定した。検量線作成用標準溶液のピーク高から検量線を作成し、試験溶液中の農薬濃度を求めた。

結果及び考察

1. 溶媒による ChE 阻害反応に与える影響

ChE 阻害作用を有する汎用農薬である有機リン系農薬のクロルピリホス、マラチオン、カルバメート系農薬のカルバリル、メソミルの ChE 阻害反応を検討した。また、同じく汎用農薬であって、ChE 阻害作用を示さないイマザリルとプロシミドンをを用いて ChE 阻害反応に対する影響を検討した。

今回検討した農薬は比較的水に溶けにくいいため、試験溶液を調製するにあたり、まず、農薬を有機溶媒に溶解する

必要があった。一方、ChE は、有機溶媒により失活するため、多量の有機溶媒が存在すると農薬による ChE 阻害反応が精度良く観察できなかつた。そこで、溶媒として水と良く混和するメタノールを選択し、酵素活性阻害作用に影響を与えないメタノール濃度について検討を行った。

メタノール濃度が 0~50% の各々異なるメタノール-水混液で酵素活性阻害の強さを比較した (Fig. 1)。その結果、メタノールが 10% 以下の濃度では使用可能であることが分かった。そこで、各農薬をメタノールに溶解した後、水で希釈し、試験溶液中のメタノール濃度が 10% となるように調製して試験に供することとした。

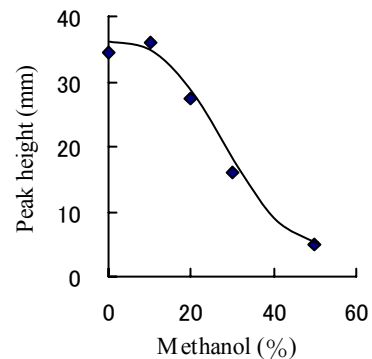


Fig.1. Influence of Methanol Concentration on the Inhibition of Enzyme Reaction

2. 酵素ディスクによる各農薬の検出限界

ChE 活性阻害測定用の簡易キットを用いて ChE 活性を阻害する農薬の有無を判定した。すなわち、当該農薬が存在しなければ酵素作用により酵素ディスクは青く発色するが、ある一定濃度以上の農薬が存在する場合、ChE 活性が阻害され、酵素ディスクは白色を呈したままであった。ChE 阻害反応の強さは農薬の種類により異なつた。クロルピリホス、マラチオンは 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上、カルバリル及びメソミルは 5 $\mu\text{g/mL}$ 以上で酵素ディスクは白色を呈した (Fig. 2(A))。また、ChE 阻害能を持たないイマザリル及びプロシミドンは 20 $\mu\text{g/mL}$ でも青く呈色した。

3. 農薬の ChE 阻害濃度の測定

マラチオン 0.2~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 溶液を反応させた際の酵素ディスクは、濃度が高くなるにしたがって発色が抑えられる傾向がみられた (Fig. 2(A))。クロルピリホス、カルバリル、メソミルにおいても同様に呈色の変化が観察された。このように試験溶液中の農薬濃度と酵素ディスクの呈色には相関性が認められたことから、呈色の変化を目視だけでなく、機器で正確に測定することによって ChE 阻害反応の強さを比較できると思われた。

そこで、薄層クロマトグラムなどのスポットの比色定量に汎用されるデンシトメーターを用いて呈色した酵素ディスクの 650 nm における吸光度を測定し、農薬濃度との関係について検討した。その結果、呈色の度合いと農薬濃度

には負の相関性が認められ、狭い濃度範囲ではあるが、検量線が作成可能であった (Fig. 2(B)) . マラチオン 0.2~0.8 $\mu\text{g/mL}$, クロルピリホス 0.4~0.8 $\mu\text{g/mL}$, カルバリル 10~20 $\mu\text{g/mL}$, メソミル 5~10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で検量線は直線性を示した (Fig. 3) . 以上の結果, 酵素ディスクの呈色をデ

ンシトメーターで測定することによって, ChE 阻害反応を定量的に比較できることが示唆された.

4. 農薬混合時の反応性の検討

有機リン系及びカルバメート系農薬は, ChE を阻害することにより殺虫効果を示し, 哺乳動物に対しては神経作用

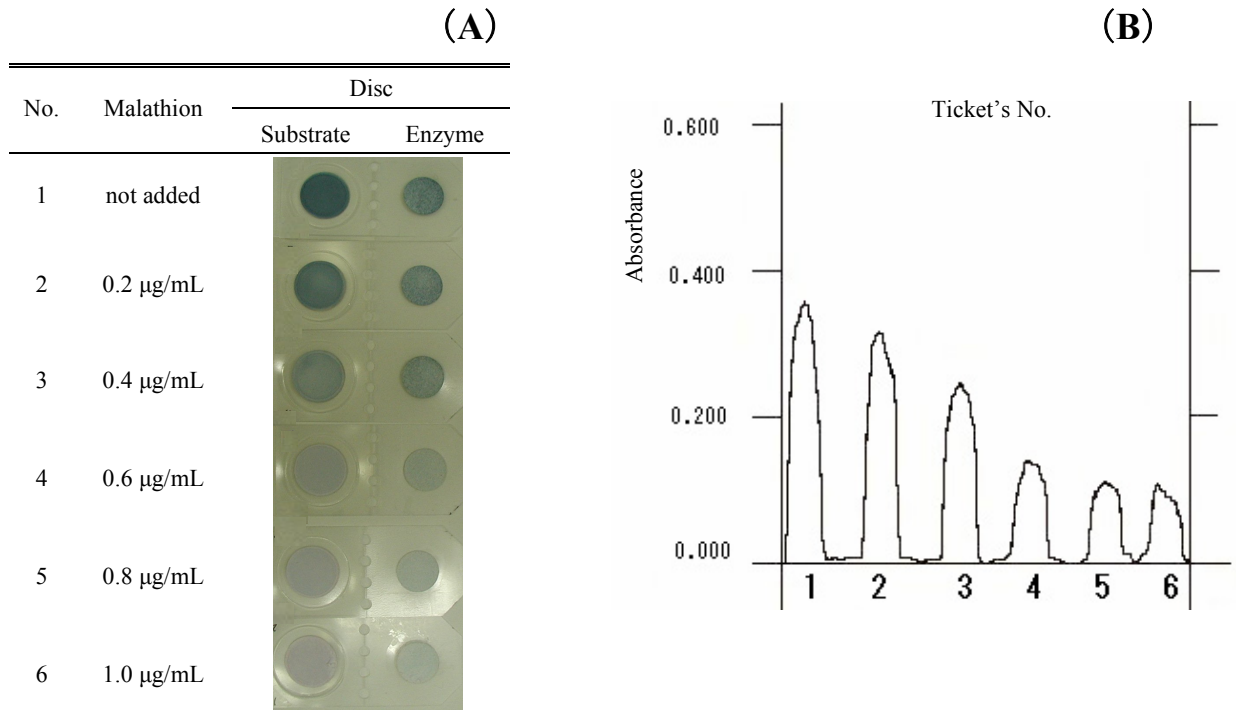


Fig. 2. Color of Ticket after Enzyme Reaction with Malathion and the Densitogram
 (A) Photograph of tickets (after enzyme reaction)
 (B) Densitogram of the color on the tickets

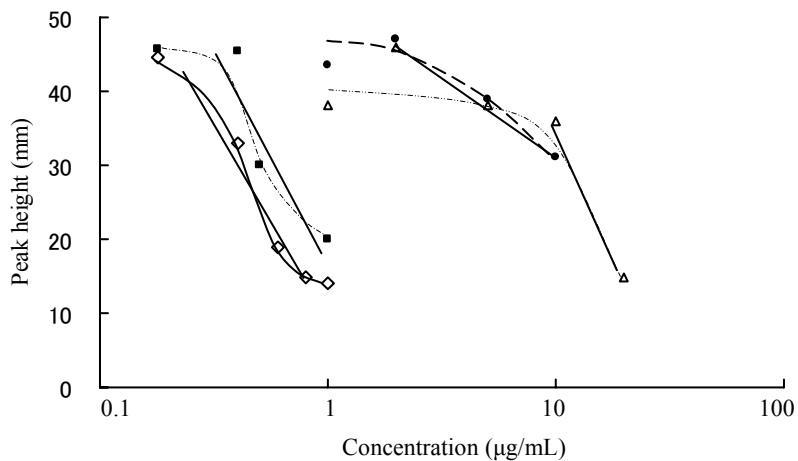


Fig.3. The Inhibition of Enzyme Activities by Pesticides

- ◇— : malathion
- -■- - : chlorpyrifos
- -●- - : carbaryl
- -△- - : methomyl

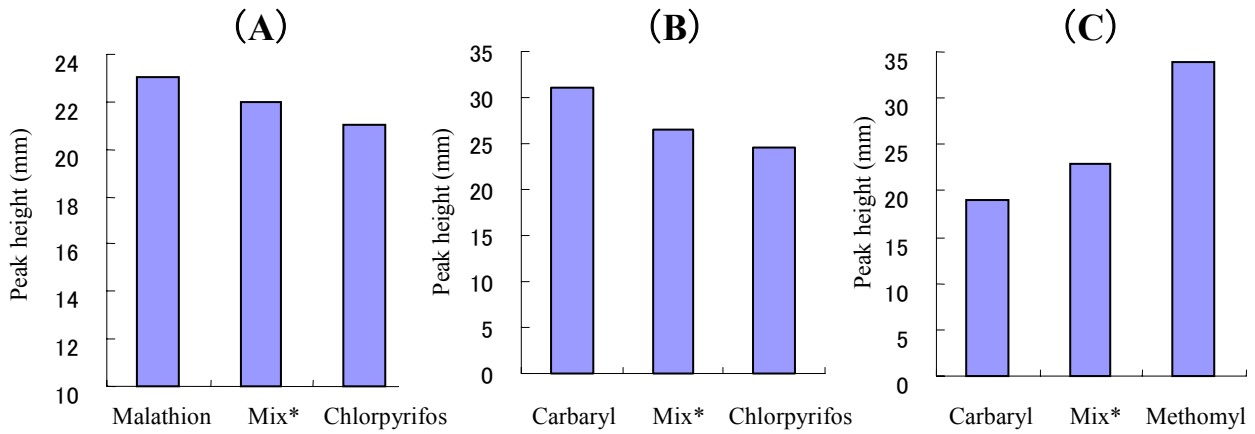


Fig. 4. Comparison of the Inhibition of Enzyme Activities with Single and Mixed Pesticides

(A) Malathion (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Chlorpyrifos (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(B) Carbaryl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Chlorpyrifos (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

(C) Carbaryl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Methomyl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

*Mix : Each standard solution was mixed with the same volume.

を発現する農薬である¹⁾。一方、有機リン系農薬並びにカルバメート系農薬は市販農産物の一部から単独あるいは複数同時に検出される²⁾。複数の類似の生理作用を有する農薬を同時に摂取した場合、生体に対して相加的、相乗的に影響を及ぼすことが報告されている³⁾。そこで、有機リン系農薬、カルバメート系農薬及びこれらが混在した場合について ChE 阻害反応の強さを比較した (Fig. 4)。

有機リン系農薬同士のマラチオン (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびクロルピリホス (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を同量混合したもの、カルバメート系農薬のカルバリル (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および有機リン系農薬のクロルピリホス (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を同量混合したもの、カルバメート系農薬同士のカルバリル (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) およびメソミル (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を同量混合したものについて、それぞれ単独の標準溶液との比較を行う。各農薬を組み合わせたときの阻害反応の強さは、それぞれの農薬単独時の強さの加算値とほぼ同等であった。さらに、ChE 阻害反応を示さない農薬であるイマザリル並びにプロシミドンそれぞれクロルピリホスと混合して ChE 阻害による影響について検討した。その結果、両者はクロルピリホスの阻害作用に影響を与えなかった。

以上のことから、複数の農薬が混在した場合、ChE の

阻害反応は相加的に現れるものと推察された。

ま と め

ChE 阻害反応を利用した簡易測定キットを用いた有機リン系及びカルバメート系農薬の定性、定量法について検討した。その結果、酵素ディスクの呈色の度合いをデンストメーターを用いて測定することにより、狭い濃度範囲ではあるが定量が可能であることが分かった。

本法を用いて各種農薬の組み合わせによる酵素阻害活性を比較したところ、各農薬の酵素阻害活性を加算した結果とほぼ一致し、ChE 阻害反応は相加的に現れることが示唆された。

なお、本研究は日本食品衛生学会第 80 回学術講演 (2000 年 11 月、郡山) において発表した。

文 献

- 1) 高橋信孝：基礎農薬学，116-123，1989，養賢堂，東京。
- 2) 高野伊知郎，永山敏廣，小林麻紀，他：東京健安研セ 年報，53，113-118，2002。
- 3) 植村振作，河村宏，辻万千子，他：農薬毒性の事典改 訂版，360-361，367，2002，三省堂，東京。