総説

イムノアッセイによる残留農薬の分析

湯 浅 洋二郎*

Analysis of Pesticide Residues by Immunoassay

Yojiro YUASA

(Environmental Immuno-chemical Technology Co., Ltd.: 1-27-14, Hamamatsu-cho,
Minato-ku, Tokyo 105-0013, Japan)

はじめに

環境中の化学物質を適正に管理することが国際的にも求められ、そのためのモニタリングシステム開発が促されている。多種多様に存在する化学物質を測定するには迅速性、操作性、経済性の面で利点を有する分析方法が必要とされ、イムノアッセイが有望な方法として研究が進められ、今日では試薬も開発されるに至っている。

イムノアッセイは臨床化学分野においてルーチン的に使用されてきた分析方法である。とりわけ食の安全性、法規制等の面から残留農薬分析への適用に向けた研究が最も進展してきた^{1)~3)}。最近では世界的にも、米国環境保護庁のような行政機関や IUPAC のような国際学会もイムノアッセイに使用する試薬の認証基準や性能ガイドラインを定め、あるいは発表している⁴⁾。

本総説ではイムノアッセイの原理とその開発、性能評価、食品における残留農薬分析への実際の応用について総説する。

1. イムノアッセイとは

イムノアッセイは鋭敏かつ特異的な分析法で、血中インシュリンの定量を先駆として臨床化学の分野で応用されてきたが⁵⁾、その対象のほとんどは高分子物質で、農薬のような低分子物質に対する抗体は作製が難しく、研究開発の進展はこの10年ほどに過ぎない⁶⁾。

イムノアッセイは抗原と抗体を反応させ、生成した複合物の標識体を利用して検出することを原理とする。農薬が抗原の場合には、抗体が結合する部位が1か所程度に限定されることから、酵素等で標識したもう一つの抗原を共存させると、抗原と標識抗原とが抗体上の限られた量の結合サイトを競合する。標識抗原の結合程度は抗原の濃度に依存し、抗体・標識抗原結合体の量が、試料中の抗原濃度の尺度となる。この原理を用いた分析法

が低分子の場合には一般的である。

イムノアッセイはこのように簡単な方法で、高感度、迅速、経済性という利点を有するものの、その開発プロセスは長く複雑である。開発の各ステップについて以下述べる。

2. アッセイの開発

2.1 ハプテンとの設計と合成

イムノアッセイ開発の中心は、農薬に対する抗体の開発にある。農薬は免疫反応を起こせない小さな分子であり、生体の免疫反応を惹起するには高分子キャリアに結合しなければならない。そのような低分子化合物をハプテンと称する。

イムノアッセイの特異性と感度は主に抗体によって決まり、優れた抗体の開発がハプテンの構造に左右されることから、ハプテンの分子設計に当たって、生体の免疫系に認識させる分子部分をどう選択するかが鍵となる。したがって、ハプテンの分子設計と合成が農薬のイムノアッセイを開発する際の最も重要な段階である⁷⁾。

ハプテン分子は、高分子キャリアとしてのタンパク質のアミノ基と結合できるようにカルボン酸誘導体とするのが一般的である。そのさいハプテンとキャリアタンパクとを隔てることが免疫系によるハプテン認識の向上に役立つので、特に炭素数2~5のメチレン基からなるリンカー構造を挿入することが好ましい。

また、このリンカーの結合するハプテン部位が、対象物質の特徴的部位から隔たるほど、対象分子の構造と電子の性質に与える影響が少なく、特異性の高い抗体が得られやすくなる。著者らの研究からハプテン分子設計の一例を図1、図2に示した。図1におけるリンカー結合位置(3)のハプテン(図2)で特異性と親和性に最も優れた抗体が得られている⁸⁾。

分子設計したハプテンは、合成ルートを選択することになる。そこには少なくとも3~5の合成ステップが含まれることが多い。合成に際しては出発材料が重要とな

* (株)環境免疫技術研究所: 〒105-0013 東京都港区浜松町
1-27-14

るが、市販材料及既知の代謝物、分解物が利用できると好都合である。

2.2 免疫原の作製

キャリアタンパクとしては、スカシガイヘモシアニン (KLH)、牛血清アルブミン (BSA)、卵白アルブミン (OVA)、免疫グロブリンが良く用いられる。ハプテンとの結合方法は、活性化エステル法と酸無水物法が一般的である⁹⁾。

2.3 抗体の作製

どのハプテン構造が抗体産生に最適かを予測することは難しいため、往々にして何種類かのハプテンを合成して抗体作製を試みることになる。

ウサギなどに免疫して抗血清 (ポリクローナル抗体) を得ることは比較的単純であるが、特異性、親和性がともにいっそう高い抗体が得られやすいことからモノクローナル抗体での研究が近年増大している。この場合には、抗体を産生する細胞をいったん取得すれば、均一で安定した抗体を随意に、無限量調製することが可能である。

細胞融合法によるその作製法は古典的な技術であり、成書に詳述されている¹⁰⁾。概略すると、まずマウスに抗原を一定期間免疫した後、その脾臓細胞を取り出し、マウス腫瘍細胞と融合させることによって得た融合細胞

(ハイブリドーマ) を、抗原や類似物質との反応性等の特性を指標とするスクリーニングにより所望の抗体を分泌する細胞を選択する。引き続いてクローニングにより単一の細胞にと分離選別し、その培養液中から精製することによってモノクローナル抗体を得ることができる。

作製した抗体はシングルタイプであり、ポリクローナル抗体と異なって単一の抗原決定基を認識する。

農薬イムノアッセイに用いる抗体の場合、残留基準値の検出に係わる親和性、そして類似農薬や代謝分解物との交差反応に係わる特異性のみならず、アルコールなどの溶媒中での反応性も重要となる。それは、水に難溶あるいは不溶の農薬が多く、抽出液を試料とするには溶媒耐性が求められることになるからである。

2.4 測定法の構築と最適化

作製した抗体と標識抗原 (標識ハプテン) を用いて測定条件を最適化し、測定系を構築する。農薬のイムノアッセイでは、標識に酵素を用いる 2 種類の ELISA 法 (酵素固相免疫吸着法) が一般的である (図 3)。

① 間接競合阻害 ELISA

タンパク質に結合したハプテンを、ポリスチレン製の 96 穴マイクロプレートやチューブあるいはビーズのような担体にコーティングする (固相化抗原)。そこに、

図 1. リンカー結合部位

図 2. ハプテンと免疫原

1. 間接競合 ELISA

2. 直接競合 ELISA

図 3. イムノアッセイの基本原則

あらかじめ決めた量の抗体と抗原(検体)を加える。固相化抗原と抗原(対象物質)との間で、抗体上の限られた結合サイトに対して競合が生じ、抗原の抗体への結合が阻害されることになる。固相化抗原に結合した抗体に、酵素標識した2次抗体(例えば、抗マウスIgG)を加えて反応させた後、酵素基質と色素を添加し、抗原濃度を測定することができる。この方法では、抗体を酵素で標識することもできる。

②直接競合阻害 ELISA

上記のような固相担体に抗体を物理的に吸着させる(固相化抗体)。そこに酵素標識抗原(酵素標識ハプテン)と抗原(検体又は対象物質)を添加する。抗原と標識抗原との間で、抗体への結合に競合が生じ、抗原の抗体へ結合が阻害されることになる。インキュベーション後、過剰の抗原と標識抗原を洗浄により除去し、発色剤を加える。酵素にペルオキシダーゼ、基質に過酸化水素、発色剤はテトラメチルベンチジンあるいはオルトフェニレンジアミンが一般的である。硫酸で酵素反応による発色を止める。発色強度を比色計で測定する。この強さは存在する酵素標識物量に直接比例し、それは試料中に存在する抗原の量に反比例する。あらかじめ作製した標準曲線から濃度を決定する。標準曲線の IC_{50} (抗体の酵素標識抗原への結合を50%阻害する抗原濃度)付近が最も正確な濃度を与える。

この方法は抗体が固相上に固定化されることから、直接競合阻害 ELISA 法と呼ばれる。間接法よりも往々にして感度が高い。

酵素標識する抗原には免疫に用いたハプテンを用いることが多いが(ホモログス系)、類似の化合物を用いるヘテログス系を工夫することによって感度を高めることが可能である。残留農薬分析の場合、残留基準値に照らして感度向上も重要な研究目標である。

一般に、酵素標識するハプテンの化学構造に関する要件は、免疫ハプテンほど厳密ではない。抗体との親和性が、免疫ハプテンよりも低くなるような化合物とすることで、抗体による認識が低下し、平衡状態が抗体-対象物質(抗原)複合体へとシフトする。これにより抗体と酵素標識抗原との会合が抑えられて非常に鋭敏なアッセイとなる。

2.5 アッセイの最適化とバリデーション

直接競合阻害 ELISA 法では、検体中の成分(マトリックス)が、分析能に非常に影響を与え得ることから、構築したアッセイの性能を実検体で調べることが重要となる¹¹⁾。すなわち、マトリックス有無での標準曲線を比較することによってその影響を調べる。食品は組成が複雑で多岐にわたり、ことに脂質、タンパク、タンニン、ポリフェノールが抗原抗体反応に干渉しうる。干渉が認められる場合、検量線がシフトしてしまう感度変化となって現れることが多い。マトリックスの影響を受け

ないモノクローナル抗体を得ることも可能であるが、干渉のある場合にはそれを排除する必要がある。そのため多数のアプローチが報告されている¹²⁾。

それと同時に緩衝液や反応液の組成、イオン強度、温度などのパラメータに照らして測定条件の最適化を図る。そのもとで測定範囲、感度、精度、正確さ、直線性、特異性を評価する。これらイムノアッセイの基本性能は、以下のように説明することができる。

①検出感度

検出限界又は統計的にゼロと異なるシグナルを出す最小濃度として表される。報告されている多くは、競合する酵素標識抗原への抗体の結合を20又は10%阻害する抗原量としている。

②精度

イムノアッセイの反応は非直線的であることから、対象物質の濃度とCV%と又はSDとの関係を明示することが重要である。最大吸光度の20から80%における濃度範囲で測定精度を調べるのが一般的である。

③正確さ

アッセイの正確さは、測定対象物質に対して真の値を測定できるかどうか反映される。実検体に既知量の対象物質を添加して回収率を計算する。機器分析法での結果を比較し、評価する。

④特異性

対象物質(抗原)と構造が類似した化合物との反応性を求めることによって確認する。

⑤相関性

最後にもう1つの重要なステップは、確立された機器分析法との比較によるバリデーションである。実検体を用い、両方法での数値の一致性を回帰式と相関係数から分析する。

3. 食品分析への適用

食品中の残留農薬分析のために多数のイムノアッセイが報告されている¹³⁾。しかしながら、機器分析法との比較評価に立って十分な精度と正確さをもち、なおかつ食品の実検体への適応とバリデーションが十分になされているものは多くなく、そして試料調製にクリーンアップを必要としないアッセイとなると更に少ない。これら個々のイムノアッセイによる残留農薬分析について殺虫剤、殺菌剤、除草剤別に概説する。

3.1 殺虫剤

①有機リン系

有機リン系殺虫剤のイムノアッセイを、Skeritt らが穀物を対象として報告している¹⁴⁾。スパイク試料のみならず、商業的な貯蔵施設からの穀物試料をも分析している。フェニトロチオン、クロルピリホスメチル、ピリミホスメチルの各々に特異的なモノクローナル抗体を用いて、小麦全粒での検出限界がそれぞれ 80 ppb, 200 ppb, 30 ppb で、GC との相関性が高く、マトリックス

の影響を受けないアッセイである。メタノール抽出液をそのまま試料とするため迅速である。小麦での再現性も良く（フェニトロチオンでCV9～15%）、非常に定量的なアッセイと言える。

②ビレスロイド

小麦でのアッセイを Skeritt らが開発している¹⁵⁾。ペルメトリンとフェノトリンに特異的なモノクローナル抗体を用いた直接競合阻害法によるアッセイである。最高感度は75 ppbであった。メタノール抽出に続くアセトン再抽出の試料調製法とすることでHPLCと測定値が一致した。

麦でのビオレスメトリンについて、HPLCと良く関連するイムノアッセイを Hill らが開発している¹⁶⁾。メタノール存在下でも反応性を有する特異的な抗体を利用しているためメタノール抽出液を試料とすることができる。小麦成分の影響はほとんどなく、検出限界も2 ppbと低く、再現性も11%以下と精度に優れている。

③有機塩素系

有機塩素系のシクロジエンは、もっぱら土壌でのモニタリングを目的として研究されているが、輸入食品でも残留分析を必要とする。Wigfield は有機塩素系殺虫剤のエンドリン、エンドスルファン、ディルドリンを測定できる各市販試薬を用いて、りんご、レタス、トマトでのスクリーニング法としての評価を行っている¹⁷⁾。

農産物を混合有機溶媒で抽出、蒸発、再溶解して試料を調製し、添加回収試験により性能評価をしている。例えば、エンドリン、ディルドリンの最小検出感度は10 ppb, 30 ppb, エンドスルフানের感度IC₅₀はりんごで80 ppbであった。標準曲線のうち直線性を示す測定範囲は10～500 ppbで、再現性はエンドスルフানের場合、トマトではCV11%以下、レタスではCV13%以下と、良好な精度であった。

④カーバメート

カルバリルのイムノアッセイを Montoya らが報告している¹⁸⁾。イムノセンサーの開発例である。競合阻害法に基づくフロースルー型のモデル的なシステムで、特異的なモノクローナル抗体を固定化したアガロースゲルをシリンジに充てんしたセンサーである。市販の飲料水とりんごジュースに応用し、回収率62～109%, RSD9～24%, 検出限界26 ng/L 及び相関性分析から、従来のELISAと同等な性能で、センサー寿命も長く、食品の品質管理に有望な方法である。

3.2 殺菌剤

殺菌剤はポストハーベストとして頻繁に使用されてきたので、イムノアッセイの重要な対象となっている。対象の過半数がベノミルカルベンダジム及びチアベンダゾールである。

①ベノミル

ワイン中のベノミル分解産物メチル2-ベンチミダ

ゾールカーバメート (MBC) のアッセイを Furguson が報告している¹⁹⁾。0.4～12.8 ppb のレベルで添加して発酵させたワインを蒸発、乾固、溶解し、超音波処理した試料について、イムノアッセイとHPLCとは、良く関連した。

彼らは同様にプロシミドンのイムノアッセイについても分析しており、5～100 ppb で添加したワインで感度IC₅₀と検出限界がそれぞれ35 ppb, 1 ppb であった。用いた抗体の交差性からイプロジオンとも反応するアッセイである。

市販ジュースでのMBCの定量については、Bushway らも報告している²⁰⁾。試料調製にクリーンアップを必要とせず、測定範囲0.5～20 ppb, 100% 付近の添加回収率という良好な性能をもつアッセイである。濃縮果汁140種類の試料を用いたHPLCとの相関性試験から得られた相関係数及び回帰式の傾きが、共に1.00近傍であること、そして12種類の濃縮果汁での測定内・測定間の再現性が4～22%で、2～19%のHPLCでの結果とほぼ同じであることから、両方法の性能を同等としている。このアッセイはベノミルとも同等に反応し、チアベンダゾールとも反応するが、後者は果汁中に干渉するほどの量が存在しないので、そのスクリーニングには適している。

ベノミルについてはLissemore らが市販キットの性能を調べ、HPLCと比較している²¹⁾。対象食品はいちごである。多成分残留分析法に準じた抽出法で調製し、アッセイ特異性（陰性テスト/真の陰性）、アッセイ感度（陽性テスト/真の陽性）共に100%の結果を示し、HPLCでの結果とも一致した。定量限界（カットオフ値）はELISAが25 ng/g, HPLCが30 ng/gであったが、ELISAの再現性はCV10%台で、約1%のHPLCほど良好ではなかった。スクリーニングには適しているが、回収率はHPLCに比べやや低かったことから、確認にはHPLCを行う必要がある。

②チアベンダゾール

Brandon らはモノクローナル抗体を用い、りんご、オレンジ、ポテト、グレープフルーツ、バナナの皮におけるチアベンダゾールアッセイを報告している²²⁾。マトリックスの影響はなく、メタノール抽出と希釈だけの簡単な試料調製である。HPLCと比較すると、HPLCの検出感度25 ppbに比べ、イムノアッセイのIC₅₀は約2～3 ppbと、より高感度であり、更に相関性も高い($r=0.97$)。定量限界はりんご、ポテト、オレンジで、それぞれ0.6 ppb, 0.5 ppb, 1.1 ppbで、モニタリングに適用的としている。

③トリアゾール

果実（りんご、なし、桃、アプリコット）におけるトラコナゾールのイムノアッセイをSabina らが報告している²³⁾。これはベンコナゾール以外のトリアゾールと

はほとんど反応しない直接競合阻害アッセイである。メタノール抽出、乾固、再溶解を必要とする試料調製法であるが、性能は添加回収率が約 80～88%，変動係数が 12%以下と良好であった。一方、果汁の場合には、希釈だけの試料調製で済み、回収率は残留基準を考慮した添加濃度において、共にほぼ 100%で、かつ CV が 0.5～1%と、再現性と信頼性に優れたアッセイと言える。

3.3 除草剤

①アトラジン

これまでの抗アトラジン抗体が、トリアジングループの農薬（シマジン、プロパジン）と交差反応性を示していることから、開発されたイムノアッセイはトリアジンのスクリーニングに適している。

スキムミルク、全乳、低脂肪乳、チョコレートミルク、脱脂乳でのアトラジンイムノアッセイを、Bushway らが報告している²⁴⁾。ポリクローナル抗体ベースの間競合阻害 ELISA で、検量線作成にミルクを利用している。ほとんどの乳製品において 0.2～6.4 ng/mL の範囲で変動係数 10%以下の良好な再現性を示している。アメトリンやプロパジンなど他のトリアジンも測定できる。食品分析への応用とバリデーションを Wittman らが行っている²⁵⁾。ミルク、果汁、野菜ジュース、缶詰コーンを対象とし、液状食品は直接試料とし、固形食品はメタノール抽出後に濃縮して、試料とした。HPLC/イムノアッセイの比較結果の一例を挙げると、ミルク、オレンジ果汁、コーンで 5.2/4.9 ($\mu\text{g/L}$), 4.6/4.8 ($\mu\text{g/L}$), 0.27/0.29 (mg/kg) と、両法で同等の値が得られた。このアッセイはアトラジンとプロパジンをほぼ同程度に検出し、シマジンとの反応性はその 20%である。

C. Wittman らはイムノクロマトグラフィーを利用したアッセイも開発している²⁶⁾。モノクローナル抗体をコーティングしたニトロセルロース膜をプラスチック支持体に固定化した DIPSTICK と称するアッセイである。液状食品のオンサイト残留分析に適し、肉眼観察では半定量であるが、ポータブルな反射率計を用いれば定量が可能となる。りんご及びオレンジのジュース、ミルク、紅茶を試料として、濃縮もクリーンアップもせずに満足ゆく結果を得ている。添加回収率が 91～105%と、HPLC での 100%と同等の成績を示し、実試料でも HPLC との間に満足すべき結果が得られている。その検出限界は 0.3 $\mu\text{g/L}$ 、測定範囲は 0.3～10 $\mu\text{g/L}$ 、感度としての IC_{50} は約 1.5 $\mu\text{g/L}$ であった。

②2,4-D

果汁での 2,4-D アッセイを Evgenia らが報告している²⁷⁾。蛍光色素で標識した 2,4-D をトレーサーとし、モノクローナル抗体との間の反応の初期反応速度 (initial rate) を利用するアッセイを開発している。分析パラメーターとして 1 秒間での初期反応速度を用いることによって、反応の平衡状態で起こりうるマトリックス干

渉を避けることが可能である。このアッセイをオレンジとぶどうの各ジュースに適用し、クリーンアップせず、希釈のみで試料調製した。両試料ともに、10～400 ng/mL の測定範囲において RSD 3%以下、回収率 91～103%の良好な性能を示した。他の構造類似物質とは反応しない、選択性の高いアッセイであり、ストップフローミキシング技術を使用すると、分析データが自動的にかつ数秒間で得られるのでルーチン分析にも可能性がある。

③イマザメタベンズ

イマザメタベンズはカナダと米国で小麦と大麦での使用に対して登録されている除草剤である。イマザメタベンズメチルとの特異性に優れたポリクローナル抗体ベースのアッセイを Newsome らが報告している²⁸⁾。測定範囲 0.5～32 ng/mL、平均 IC_{50} 12.6 ng/mL、測定値の平均 CV 3%、大麦での回収率約 90%の良好な性能である。しかし、試料調製にはメタノール抽出、蒸発、水溶解、 C_{18} カラム、蒸発乾固からなる煩雑なクリーンアップステップが必要である。

④その他

肉を分析対象として、超臨界流体抽出を活用してマトリックス干渉を排除した残留農薬イムノアッセイを、アラクロル、カルボフラン、アトラジン、ベノミル、2,4-D について Kisouk らが開発している²⁹⁾。固相に磁性粒子を用いた試薬である。超臨界流体抽出液を希釈し、フィルター過した試料とすることで回収率が約 100%となり、正確な測定が可能となった。最小検出感度は 2,4-D で 14 ppb、他は 1～5 ppb と、基準値以下であり、肉製品のスクリーニングに有効と言える。

おわりに

高い感度、優れた迅速性、高い検体処理能力といった利点からイムノアッセイが、規制対象残留農薬の増大に対応しうる有力な分析手段になる可能性が現実のものとなっている。イムノアッセイを開発する技術的基盤の整備が進み、実用に向けてのバリデーションもなされ始めている。特に米国においては公的な受容に耐えうる試薬が開発され、土壌や水を限定的な用途対象として公的承認を獲得し始めている。

しかしながら、実用性能のあるアッセイは未だ開発が限られているし、適用できる対象食品も限られている。食品衛生法での対象農薬を 200 種類とすることが予定されている現在、対象農薬並びに適用食品を増やすことが急務と言える。このための研究が更に高まり、広がることが期待される。

研究開発の促進のみならずイムノアッセイの実用化と普及には、その公的受容が望まれるところである。測定試薬の認証、農薬登録申請におけるイムノアッセイデータの許容が欧米で始まっていること、食品の分析検査が双方向性を持たざるを得ないこと、そして流通の国際性

を考えると、単に公的受容にとどまらず、グローバルスタンダードの実現も将来的に予想される。その時、イムノアッセイは食品の残留農薬のみならず多種多様な化学物質を、食や水や土壌といった様々な環境中で分析する上で必要不可欠の手段となろう。

謝 辞

本総説の執筆の機会を賜るとともに、作成に当たって御校閲と御指摘を賜りました星薬科大学教授中澤裕之博士に深謝致します。

文 献

- 1) Stanker, L. H., Beier, R. C.: ACS Symposium Series **621**, 2~16 (1996).
- 2) Skeritt, J. H.: "New Frontiers in Agrochemical Immunoassay" p. 1~16 (1995) AOAC International.
- 3) Aga, D. S., Thurman, E. M.: ACS Symposium Series **657**, 1~20 (1997).
- 4) Krotzky, A. J., Berndt, Z.: Pure and Appl. Chem. **67**, 2,065~2,088 (1995).
- 5) Yalow, R. S., Berson, S. A.: Nature **184**, 1,648 (1959).
- 6) Sherry, J. P.: Critical Reviews in Analytical Chemistry **23**, 217~300 (1992).
- 7) Szurdoki, F., Bekheit, H. K. M., Marco, M., Goodrow, M. H., Hammock, B. D.: "New Frontiers in Agrochemical Immunoassay" p. 39~63 (1995) AOAC International.
- 8) 林 昌郎: 免疫化学測定法研究会年報 **1**, 50~52 (1997).
- 9) Abad, A., Montoya, A.: J. Agric. Food Chem. **42**, 1,818~1,823 (1994).
- 10) 安東民衛, 千葉 大: "単クローン抗体実験操作入門" (1993) 講談社.
- 11) Jourdan, S. W., Scutellaro, A. M., Hayes, M. C., Herzog, D. P.: ACS Symposium Series **621**, 17~28 (1996).
- 12) Skeritt, J. H., Amita, Rani, B. E.: ACS Symposium Series **621**, 29~43 (1996).
- 13) Bushway, R. J., Fan, T. S.: Food Technology **49**, 108~115 (1995).
- 14) Skeritt, J. H., Hill, A. S., Beasley, H. L., Edward, S. L., McAdam, D. P.: J. AOAC Int. **75**, 519~528 (1992).
- 15) Skeritt, J. H., Hill, A. S., McAdam, D. P., Stanker, L. H.: J. Agric. Food Chem. **40**, 1,287~1,292 (1992).
- 16) Hill, A. S., McAdam, D. P., Edward, S. L., Skeritt, J. H.: J. Agric. Food Chem. **41**, 2,011~2,018 (1993).
- 17) Wigfield, Y. Y., Grant, R.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. **49**, 342~347 (1992).
- 18) Gonzalez-Martinez, M. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A., Abad, A., Montoya, A.: Anal. Chem. **69**, 2,812~2,818 (1997).
- 19) Ferguson, B. S., Kelsey, D. E., Fan, T. S., Bushway, R. J.: The Science of the Total Environment. **132**, 415~428 (1993) Elsevier Science Publishers B. V.
- 20) Bushway, R. J., Young, B. E. S., Paradis, L. R., Perking, L. B., Martin, S. K., Brown, M. P.: J. AOAC Int. **77**, 1,237~1,242 (1994).
- 21) Lissemore, L., Ripley, B. D., Kakuda, Y., Stephenson, G. R.: J. Environ. Sci. Health **B31**, 871~882 (1996).
- 22) Brandon, D. L., Binder, R. G., Bates, A. H., Montague, Jr. W. C.: Food & Agricultural Immunology **7**, 99~108 (1995).
- 23) Sabina, C., Anna, A., Silvia, P.: J. Agric. Food Chem. **44**, 3,849~3,854 (1996).
- 24) Bushway, R. J., Perkins, L. B., Hurst, H. L.: Food Chem. **43**, 283~287 (1992).
- 25) Wittmann, C., Hock, B.: J. Agric. Food Chem. **41**, 1,421~1,425 (1993).
- 26) Wittmann, C., Bilitewski, U., Giersch, T., Kettling, U., Schmid, R. D.: Analyst **121**, 863~869 (1996).
- 27) Evgenia, G. M., M. Paz, AC., Sergei, AE., Augustina, GH., Dolores, PB.: Analyst **122**, 863~866 (1997).
- 28) Newsome, W. H., Collins, P. G.: Bull. Environ. Contam. Toxicol. **47**, 211~216 (1991).
- 29) Kisouk, N., King, J. W.: J. Agric. Food Chem. **42**, 1,469~1,474 (1994).