

( 計 画 書 )

環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

# 化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験計画書

環境技術開発者	日本エンバイロケミカルズ株式会社
技術・製品の名称	《技術名》ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISA キット（マグネティック・パーティクル）

平成17年10月

名古屋市

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術 実証試験要領(第2版)(平成17年5月16日 環境省総合環境政策局)」(以下、「実証試験要領」という。)に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の2者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

(実証機関)

名古屋市環境科学研究所

所 長 柴田 伸幸

(環境技術開発者)

日本エンバイロケミカルズ株式会社

代表取締役社長 小林 厚夫

## 目 次

1 . 実証試験の概要と目的 .....	1
1.1 実証試験の概要と目的 .....	1
1.2 実証試験の視点 .....	1
2 . 実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌 .....	2
2.1 実証試験の参加組織 .....	2
2.2 実施体制 .....	2
2.3 実証試験参加者の責任分掌 .....	3
3 . 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要 .....	4
3.1 実証対象技術の原理 .....	4
3.2 実証対象製品のデータ .....	4
4 . 実証試験のデザイン .....	6
4.1 実証試験の期間 .....	6
4.2 実証試験の内容 .....	7
4.3 実証対象製品の受け入れと管理 .....	8
4.4 実証試験の方法 .....	10
(1) 基本的な性能試験 .....	11
測定範囲試験 .....	11
検出下限及び定量下限試験 .....	11
繰返し再現性試験 .....	11
日間再現性試験 .....	12
期間再現性試験 .....	12
キット間再現性試験 .....	12
交差反応性試験 .....	12
(2) 実用的な性能試験 .....	13
回収特性試験 .....	13
測定精度試験 .....	13
5 . データの品質管理 .....	14
6 . データの管理、分析、表示 .....	14
7 . 監査 .....	14
8 . 評価 .....	14

付録 1 : 技術の先進性、その他 .....	1 5
付録 2 : 環境技術開発者による性能試験結果 ( 資料 1 ~ 資料 4 ) .....	1 6
付録 3 : 取扱説明書 .....	2 3
付録 4 : 品質管理マニュアル ELISA 法	
付録 5 : 品質管理マニュアル 機器分析	

## 1．実証試験の概要と目的

### 1.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより、環境技術実証の手法・体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成17年5月16日 環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領（第2版）に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ELISA法）による簡易分析技術とする。

### 1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

製品性能の信頼性

一般環境モニタリングでの実用性

製品操作等の簡便性

## 2. 実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

### 2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表 2.1 実証試験参加組織

実証機関	団体名	名古屋市環境科学研究所
	住所	〒457-0841 名古屋市南区豊田 5-16-8
	担当者所属・氏名	水質部 小島節子
	電話番号	052-692-8481
	FAX 番号	052-692-8483
	E-mail アドレス	kojima@nagoyakankaken.office.to
環境技術開発者	企業名	日本エンバイロケミカルズ株式会社
	住所	〒105-0023 東京都港区芝浦一丁目 2 番 1 号 シーバンスN館 9 階
	担当者所属・氏名	事業開発室 室長 道正 伸
	電話番号	03-5444-9891
	FAX 番号	03-5444-9860
	E-mail アドレス	eco@jechem.co.jp

### 2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

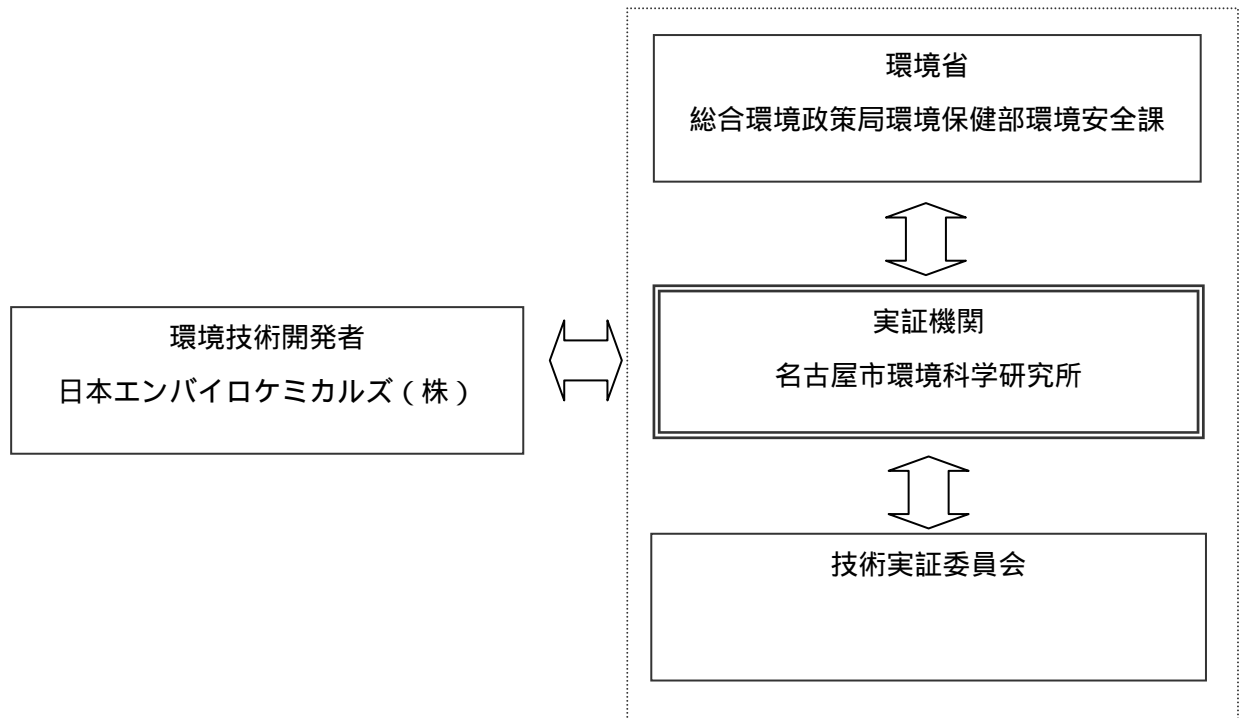


図 2.2 実証試験の実施体制

## 2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験 参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の統括責任者	所長	柴田 伸幸
	実証試験における ELISA 法の責任者	水質部長	須賀 博之
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	水質部研究員	山守 英朋
	実証試験における ELISA 法担当者	ダイキシン分析センタ - 研究員	鈴木 直喜
	実証試験における機器分析の責任者	水質部長	須賀 博之
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	水質部 主任研究員	渡辺 正敏
	実証試験における機器分析担当者	ダイキシン分析センタ - 主任研究員	大場 和生
	実証試験における機器分析担当者	〃 研究員	鈴木 直喜
	実証試験における精度・技術管理者	ダイキシン分析研 究センタ-長	加藤 光雄
	実証試験における精度管理担当者	水質部 主任研究員	安藤 良
	実証試験における精度管理担当者	大気騒音部 研究員	中島 寛則
環境技術開発者	実証対象製品の提供	事業開発室室長	道正 伸
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	研究開発部 リサーチマネージャー	藤本 茂
	実証試験実施上の参考情報の提供	研究開発部 リサーチマネージャー	藤本 茂



### 3. 実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

#### 3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）に対する特異的なポリクロール抗体を応用した、環境中（対象環境媒体：水質、底質、生物）のPBDE測定ELISAキットである。

ELISAの原理は、競合反応（PBDE濃度が高い試料では吸光度が低く、PBDE濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マグネティック・パーティクルを使用したキットである。

#### 3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3.2 実証対象製品のデータ（1）

項目	記入欄
製品名	ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）ELISAキット（マグネティック・パーティクル）
型番	《販売元コード》未定（製造元コード：PN500090）
販売・製造元	《販売》和光純薬工業（株）《輸入》日本エンバイロケミカルズ（株） 《製造》Abraxis LLC（米国）
重量（キット一式、g）	1,300g
価格（円）	未定
分析対象物質	ポリ臭化ジフェニルエーテル
対象環境媒体	水質・底質・生物・その他（土壌・穀物）水試料以外は抽出操作が必要。
利用用途	環境水（地下水、表流水、飲料水）、土壌・底質、魚類細胞、等のモニタリング
標準試薬・種類	付属（調製済/調製要）PBDE-47 0,0.025,0.05,0.1,0.5,1.0ppb 各50%メタノール溶液
操作環境（室温）	15 ~ 30
製品保管条件	2~8
製品保証期間	製造後12ヶ月間
同時測定数（最多）	40試料（n=2で1キット使用時）
測定時間	1.1時間（固相抽出等の試料の前処を除く）

表 3.2 実証対象製品のデータ (2)

項目	記入欄
1 . 基本的な性能	
測定範囲	0.025 ~ 1 $\mu$ g/L (添付資料 : PBDE-1)
検出下限及び定量下限	検出下限 : 0.020 $\mu$ g/L 定量下限 : 0.025 $\mu$ g/L
繰返し再現性	標準偏差 : 0.006 変動係数 : 2.74%
日間再現性	標準偏差 : 0.0021 変動係数 : 2.2%
期間再現性	標準偏差 : 0.0045 変動係数 : 4.74%
キット間再現性	標準偏差 : 0.02 変動係数 : 3.89%
交差反応性	類縁体等との交差反応性 (添付資料 : PBDE-2)
その他	魚類細胞測定時の GC/MS との相関性 : R = 0.872
2 . 実用的な性能	
回収特性	環境水 (水道原水、井戸水 = 飲料水、池、配水路) への添加回収実験結果 (添付資料 : PBDE-3)
測定精度等	
その他	
試験責任者	Barbara Hughes (QA Manager)
試験年月日	平成 17 年 8 月 30 日

#### 4．実証試験のデザイン

##### 4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 11 月中旬～平成 17 年 1 月初旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1 実証試験のスケジュール（予定）

	10 月		11 月	12 月				2 月	
	1 週	2 週	4 週	1 週	2 週	3 週	4 週		4 週
実証試験計画の策定									
対象技術の選定、計画書案作成									
実証試験計画書策定、承認									
実証試験の実施									
測定範囲の検討									
検出限界及び定量限界の検討									
繰返し再現性の検討									
日間再現性の検討									
期間再現性の検討									
キット間再現性の検討									
交差反応性の検討									
回収特性の検討									
測定精度の検討									
監査の実施									
実証試験中間報告									
技術実証委員会の実施									
報告書の提出									

## 4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
1．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)キット間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるキット間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
2．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

#### 4.3 実証対象製品の受け入れと管理

##### (1) 実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

##### (2) ELISA キットの管理

ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表 (様式 4.3)

受領年月日 \_\_\_\_\_ 時 分

番号 (管理番号) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

メーカー名 \_\_\_\_\_

品名 \_\_\_\_\_

Lot . No. \_\_\_\_\_

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ( )

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 \_\_\_\_\_

保管温度 \_\_\_\_\_

担当者 \_\_\_\_\_

(移動・分割等の記録)

番号 (管理番号) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

メーカー名 \_\_\_\_\_

品名 \_\_\_\_\_

Lot . No. \_\_\_\_\_

搬入時確認事項

包装等に破損がない

保管温度 ( )

搬入時の温度管理

使用期限

その他異常なし

保管場所 \_\_\_\_\_

保管温度 \_\_\_\_\_

担当者 \_\_\_\_\_

(移動・分割等の記録)

#### 4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

##### ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル ELISA 法 (PBDE)」の試験操作手順 (一般的な事項) に従って行う。

##### イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属する標準物質の希釈濃度系列を使用する。

##### ウ．吸光度の測定

吸光度は、ハンディフォトメーター (Model-6, アヅマックス社製) で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

##### エ．検量線の作成

試験管毎に同時に測定したゼロブランク (BLK: 添付の希釈液等) 及び標準溶液指定濃度系列の吸光度 (3重測定の平均値) から、4-parameter logistic fitting 後、検量線を作成する。

(検量線作成用の解析ソフト: GENESIS-LITE)

##### オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

### (1) 基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

#### 試験用試料溶液の調製

ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE）の市販標準物質（PBDE Standard Solution PBDE47：和光純薬製）を用いて、50%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1 標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）
標準溶液指定濃度系列	ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47）	0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0
測定範囲 日間再現性 期間再現性 キット間再現性	ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47）	0, 0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0
検出下限 1・2 及び定量下限	ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47）	0, 0.025
繰返し再現性	ポリ臭化ジフェニルエーテル（PBDE-47）	0.10
交差反応性	PBDE Congener99 PBDE Congener28 PBDE Congener100	0.025, 0.05, 0.10, 0.5, 1.0 0.05, 0.10, 0.20, 1.0, 5.0 0.10, 0.5, 5.0, 10, 50

#### 測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき 3 重測定を行い、3 個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、各調製濃度と実測濃度との比較、変動係数から指定された測定範囲の妥当性について検討する。

#### 検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。なお、この場合の検出下限値を検出下限 1 とする。これとは別に、指定濃度系列 0 濃度の吸光度を 10 回測定し、その標準偏差（SD）から得られる 3SD 値（吸光度）を 0 濃度の吸光度から差し引いた吸光度より、検量線を用いて換算濃度を求める。この濃度を検出下限 2 とし、検出下限 1 および申請データと比較検討する。



#### 繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を3重測定で8回測定し、得られた8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数(n=8)から、繰返し再現性について検討する。

#### 日間再現性試験

同一測定者が1週間の異なる3日間において、同一ロットの異なる試験管を用いて「測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3日間の比較から日間再現性について検討する。

#### 期間再現性試験

同ロット(製造年月日が同じ)のキットの試験管を用いて、1ヶ月以上離れた時期に「測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、キット間の比較から期間再現性について検討する。

#### キット間再現性試験

同一ロット2キット及び異なるロット1キットの3キットを用いて、同日に「測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からキット間再現性について検討する。

#### 交差反応性試験

ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47)及び類似物質(PBDE Congener99, PBDE Congener28, PBDE Congener100)について調製した試料溶液で吸光度曲線(実測値は3重測定の平均値から求める)を描き、吸光度曲線から類似物質の50%発色阻害濃度を求める。(ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47)の50%阻害濃度/類似物質の50%阻害濃度)×100(%)で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。類似物質に関して、調製した試料溶液のみでは50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20または10%阻害濃度で代用する。

## (2) 実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

### 回収特性試験

グラスファイバーフィルター(GFC:孔径1.2 $\mu$ m)を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質(ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47))を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度(添加濃度)は、表4.4.2のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、3重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：ポリ臭化ジフェニルエーテル(PBDE-47)	0.1 $\mu$ g/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	0, 1, 5, 10, 50 mg/L

### 測定精度試験

3地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び必要に応じて固相抽出による前処理操作を行って測定する。

河川水中からはポリ臭化ジフェニルエーテルは検出されていないことから、ポリ臭化ジフェニルエーテル標準液(PBDE-47)を添加して、所定のマニュアル(前処理法を含む)に従って機器分析を行い、ELISA法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性(測定時間、操作数)について、環境試料への適用性の観点から検討する。

## 5．データの品質管理

実証試験は、「品質管理マニュアル」に従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

## 6．データの管理、分析、表示

### (1) データの管理

実証試験で得られたデータは、識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10年間維持した後、廃棄するものとする。

### (2) データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

## 7．監査

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に1回以上監査を実施する。

## 8．実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

## 付録1 技術の先進性、その他

### 1. 技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。

#### 技術の先進性

抗原抗体反応を応用した本技術は、迅速で経済的なオンサイトでの半定量キットとして、あるいはラボでの精密な定量キットとして使い分けることができる。

この技術は簡便な前処理で多数のサンプルを同時に測定でき、有害な有機溶媒も使用しない。

#### 学会発表

Development of a Sensitive Magnetic Particle Immunoassay for Polybrominated Diphenyl Ethers. Paper presented at the 2005 Dioxin Conference, held in Toronto Canada on 8/22/05(添付資料: PBDE-4)

### 2. その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。

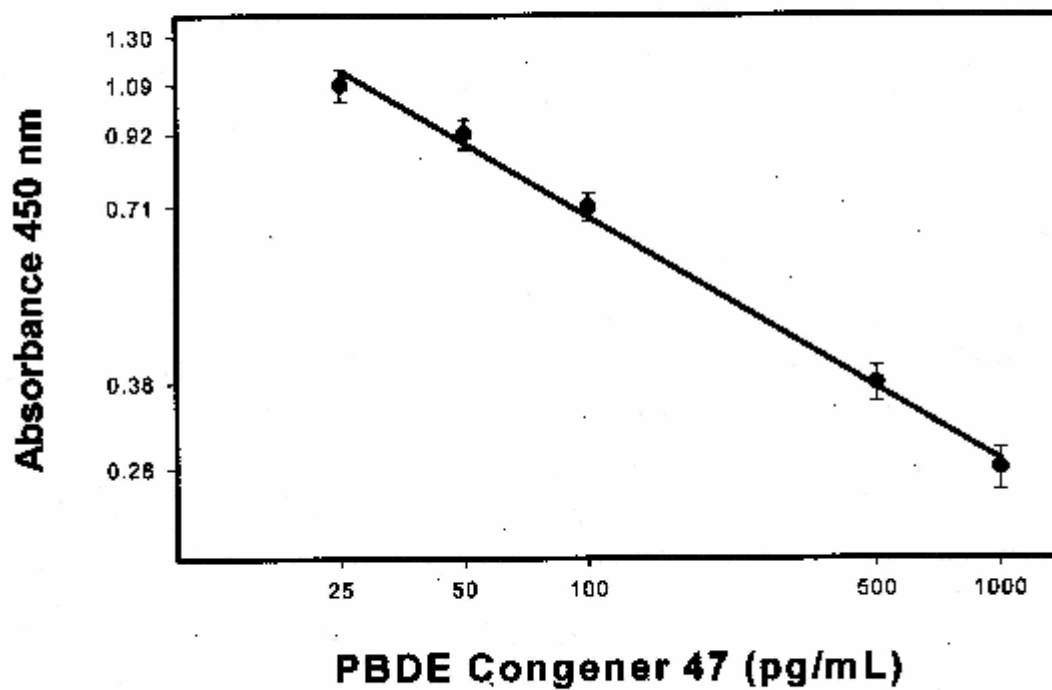
#### 今後の取り組み

- ・ 生体資料(母乳)への適用を検討中。

付録2 環境技術者による性能試験結果

添付資料 PBDE-1

1-① 測定範囲



定量範囲 : 0.025 ~ 1  $\mu$ g/L

添付資料 PBDE-2

1-⑦ 交差反応性

(B/B<sub>0</sub>=90%から算出した検出下限および阻害率50%となるのに必要な濃度の2通りで表現しています。)

LDD50% B/Bo Compound	(ppb)	(ppb)
PBDE Congener 47	0.017	0.135
PBDE Congener 99	0.02	0.15
PBDE Congener 28	0.045	0.9
PBDE Congener 100	0.055	5.5
PBDE Congener 153	0.075	10
PBDE Congener 154	3.5	580
PBDE Congener 183	13.5	2000
PBDE Congener 209	370	3000
2,2',4,5' Tetrabromobiphenyl	6.6	250
2,2',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl	130	>1000
2,4',5 Tribromobiphenyl	160	2600
2,2',5 Tribromobiphenyl	175	2900
2,4,5 Tribromobiphenyl	240	3200
2,2',4,5',6 Pentabromobiphenyl	320	>1000
3,3',4,4',5,5' Hexabromobiphenyl	>1000	>1000
2,2',4,4',6,6' Hexabromobiphenyl	>1000	>1000
Decabromobiphenyl	>1000	>1000
PCB Aroclor 1254	3	180
PCB Congener 37	160	2000
PCB Congener 77	>1000	>1000
2,2',4,4' Tetrachlorobiphenyl	16	360
2,2',4,4',5 Pentachlorobiphenyl	54	1500
PCP	3300	>10,000
2-4-D	>10,000	>10,000

The following compounds demonstrated no reactivity in the PBDE RaPID Assay at concentrations up to 10,000 ppb: Biphenyl, 2,5-Dichlorophenol, 2,3,5-Trichlorophenol, Di-n-octyl-phthalate.

添付資料 PBDE-3

2-① 回収特性

環境水への添加回収実験

環境水4サンプル（水道原水、井戸水=飲料水、池、配水路から採取）への添加回収実験結果。

PBDE 添加量 (ppt)	回収実験		
	平均値 (ppt)	標準偏差 (ppt)	回収率 (%)
62.5	56.4	2.87	90.2
125	131.5	5.30	105.2
250	270.6	12.8	108.3
500	510.4	28.32	102.1
Average			101.4

## Development of a sensitive magnetic particle immunoassay for polybrominated diphenyl ethers

Fernando Rubio<sup>1</sup>, Carmen D Parrotta<sup>1</sup>, Qing X Li<sup>2</sup>, Weilin L Shelver<sup>3</sup>, Fernando Rubio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Abraxis Llc

<sup>2</sup>Department of Molecular Biosciences and Bioengineering, University of Hawaii at Manoa

<sup>3</sup>USDA-ARS Biosciences Research Laboratory

### Introduction

Polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixtures are manufactured as flame retardant additives for electronic equipment, plastics and textiles<sup>1</sup>. Three types of commercial PBDE mixtures find wide application<sup>2</sup>, namely "pentaBDEs", "octaBDEs", and "decaBDEs". The penta formulation consists of a mixture of PBDE congeners that includes<sup>3</sup> BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, and BDE-154. The octa formulation consists primarily of BDE-183, while the deca formulation consists primarily of BDE-209. North America accounts for approximately 98% of the global demand for the penta formulation<sup>4</sup>.

PBDEs are ubiquitous environmental contaminants, their bioaccumulation has led to the detection of PBDEs in many species of wildlife<sup>5</sup>, human blood plasma<sup>6</sup> and in human mother's milk<sup>7</sup>. PBDEs are structurally similar to polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs), and thyroid hormones, and therefore may interfere with thyroid hormone homeostasis<sup>8</sup>. Because of their potential health consequences it is desirable to have a rapid and high throughput assay to monitor PBDEs.

The quantification of PBDE samples is usually done by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or GC/high resolution MS (GC/HRMS). While these methods are reliable, they are sophisticated and require extensive purification using large volumes of extraction solvents. The analysis of large numbers of samples using these techniques is not feasible. Therefore, a rapid, simple, and cost-effective method for the screening and quantitative analysis of PBDEs is required. Rapid, sensitive, accurate, and cost-effective enzyme immunoassays (ELISAs), have provided the analytical chemist an alternative tool to traditional instrumentation methods.

Magnetic particle-based ELISAs have previously been described and widely applied to the detection of pesticides and other environmental contaminants<sup>9-11</sup> in various sample matrices, including water, soil, produce, and fish tissue. The uniform dispersion of the particles throughout the reaction mixture allows for rapid reaction kinetics, precise addition of antibody and superior analytical sensitivity. This paper describes the assay performance of a PBDEs magnetic particle-based ELISA in ground water.

### Materials and Methods

Carboxy terminated superparamagnetic particles of approximately 1 μm diameter were obtained from Seradyn (Indianapolis, IN). N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDAC) were purchased from (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Rabbit anti-PBDEs serum #122 was produced by immunizing the rabbit with 4-(2, 4-dibromo-5-(2, 4-dibromophenoxy)phenoxy)butyrate-BSA in according to Shelver et al.<sup>12</sup>. The PBDE ligand and horse radish peroxidase (HRP) were conjugated via NHS and EDAC reaction to yield PBDEs-HRP conjugate (Abraxis, Warminster, PA). TMB peroxidase substrate was purchased from BioFx (Randallstown, MD). PBDEs, PCBs, PCP and 2, 4-D were obtained either from Chem Service, West Chester, PA or AccuStandard, New Haven, CT).

The anti-PBDEs coupled magnetic particles were prepared by NHS/EDAC activation, according to the procedure supplied by Seradyn. The unbound NHS/EDAC was removed from the particles by magnetic separation and washing two times with 50 mM of 2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid (MES) buffer (pH 6.0). The PBDE antiserum and the activated particles were incubated overnight at room temperature with agitation. The reaction was then quenched with glycine buffer and the covalently coupled anti-PBDEs particles were washed and diluted with a Tris-saline/BSA