

図10. メチオカルブ標準品のMSスペクトル

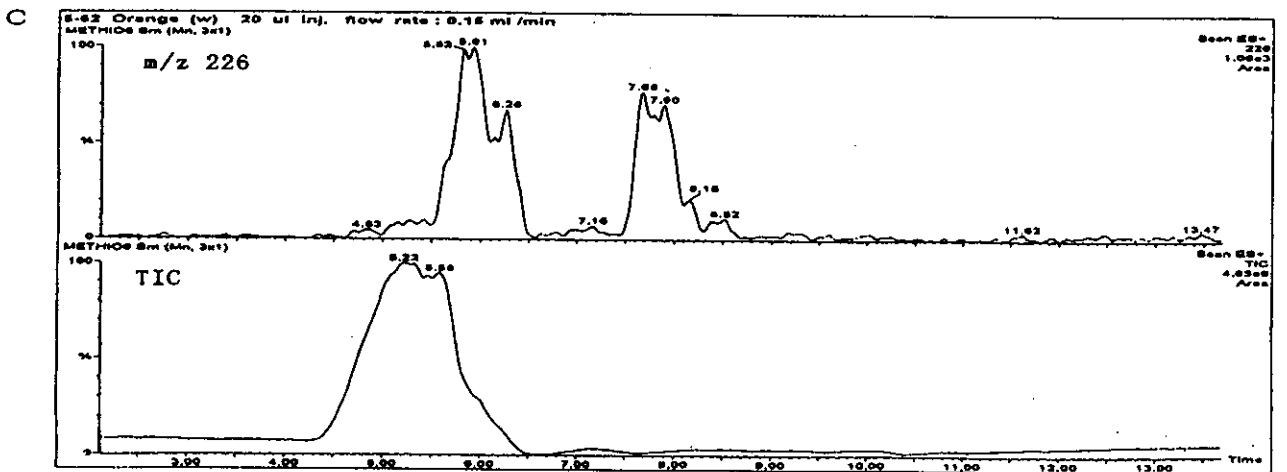
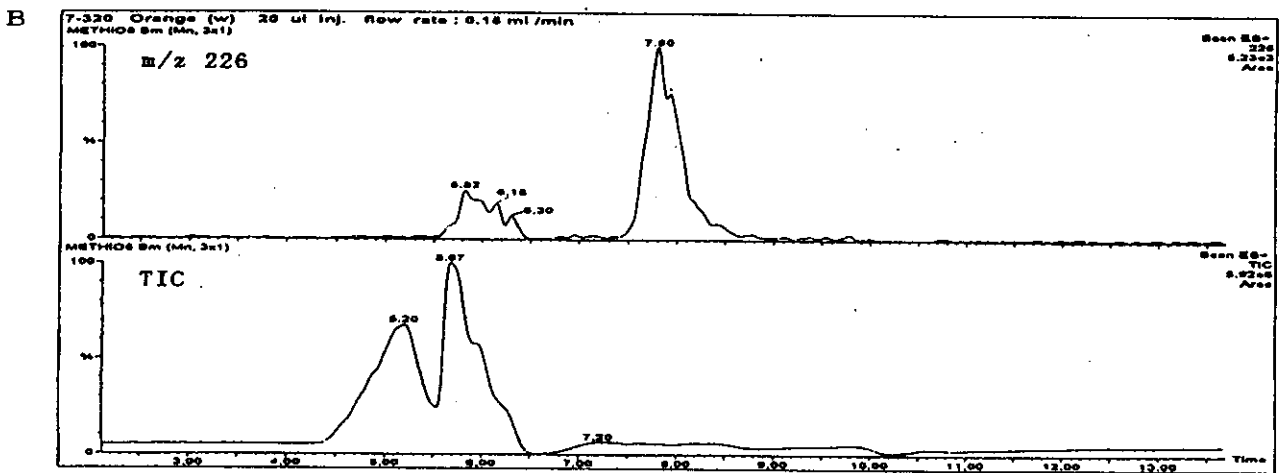
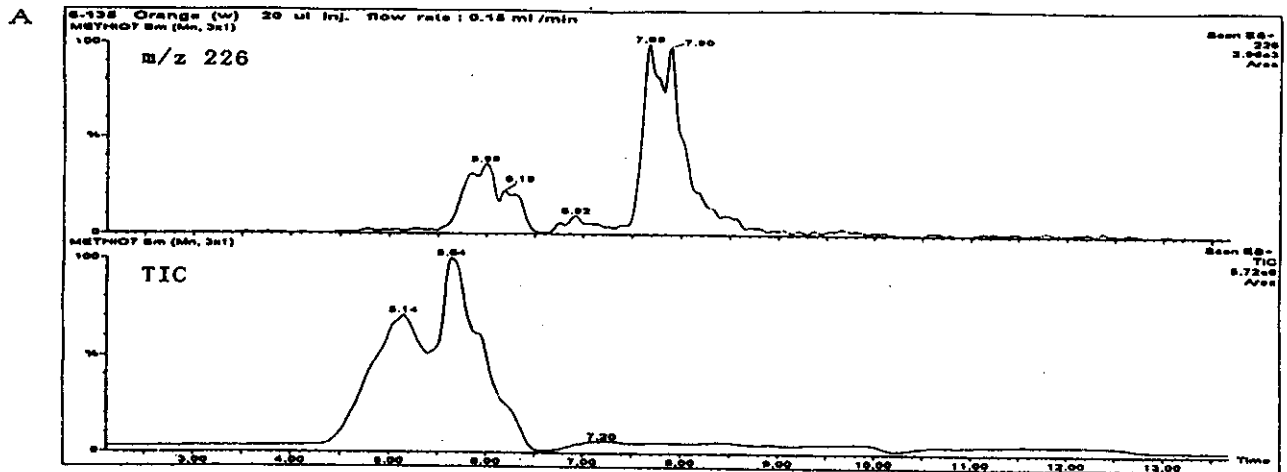


図11. メチオカルブ残留食品(オレンジ)のMSクロマトグラム

A : 0.03ppm残留品

B : 0.04ppm残留品

C : 0.05ppm残留品

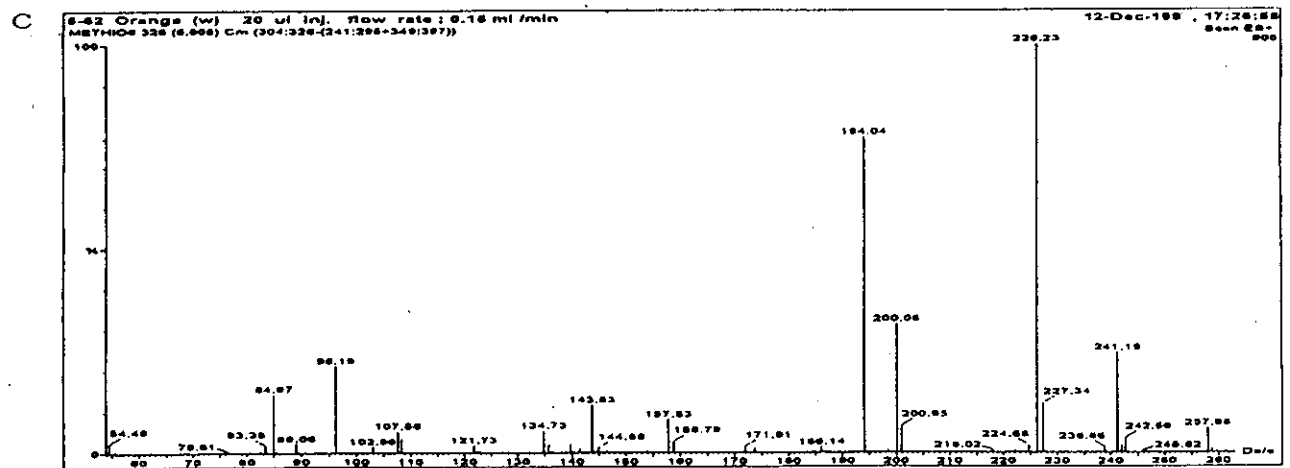
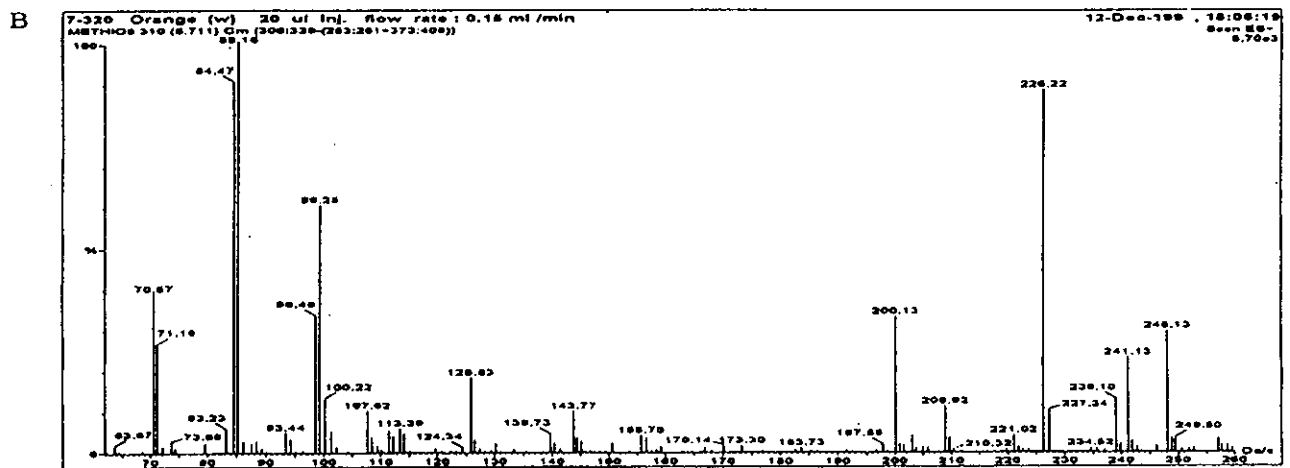
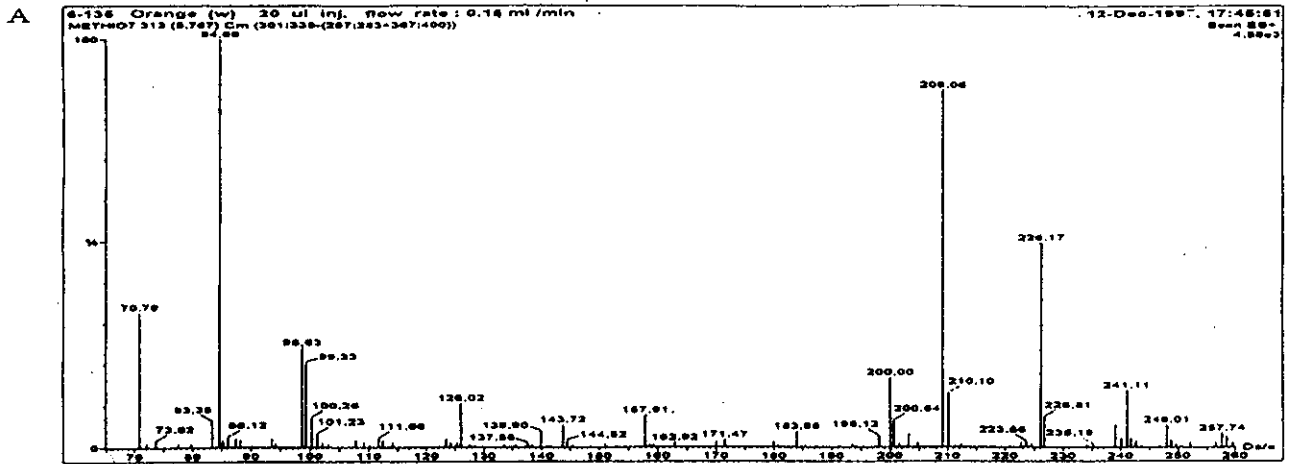
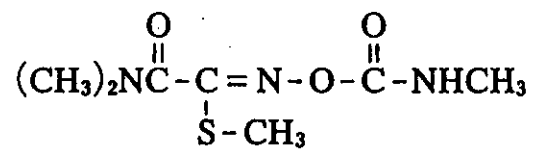


図12. メチオカルブ残留食品(オレンジ(全果))のMSスペクトル

A : 0.03ppm残留品

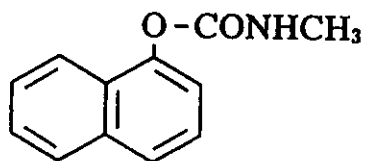
B : 0.04ppm残留品

C : 0.05ppm残留品



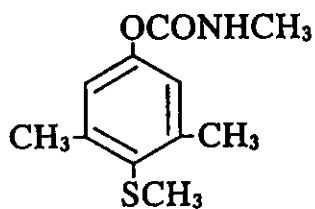
$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} : 219.3$

図13. オキサミルの構造式



$\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2 : 201.2$

図14. カルバリルの構造式



$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S} : 225.3$

図15. メチオカルプの構造式

分担研究報告書

農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究

(1) ELISA による柑橘類中イマザリルの分析

分担研究者 中澤 裕之

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

農薬イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究

（１）ELISAによる柑橘類中イマザリルの分析

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授

研究要旨

イマザリルは、イミダゾール系殺菌剤として、主に輸入柑橘類に対し、貯蔵、保存中の腐敗防止を目的にポストハーベスト農薬として使用されている農薬である。近年、輸入農産物量が増大する中、迅速且つ簡便な分析法の開発が急務とされている。イマザリルは、輸入柑橘類からの検出頻度が非常に高いことが知られている。このような実態からも、多数の検体を対象とした迅速なスクリーニング法が開発が要求されている。

本研究では、柑橘類成分の影響を受けない ELISA を用いた柑橘類中のイマザリル分析法を構築し、その有用性を検討するために従来からの分析法である HPLC と相関性試験を試みた。その結果、双方には、非常に高い相関関係が認められ、本法が日常分析法として高い有用性を有することが示唆された。

研究協力者

林 昌郎 (株)コスモ総合研究所

に渡っており、時間を要する。更に、多量の有機溶媒の消費による分析者に対する健康影響も無視することは出来ない。

A. 研究目的

イマザリル(1-(β-allyloxy-2,4-dichloro-phenethyl)imidazole)は、イミダゾール系殺菌剤として、特に、輸入柑橘類に対し、貯蔵、保存中の腐敗防止を目的にポストハーベスト農薬として広範に使用されている農薬である。日本国内においては、食品添加物(防かび剤)として指定されており、平成5年9月に食品衛生法に基づき、レモン、オレンジ及びグレープフルーツに対して 5ppm と残留農薬基準値が設定された。日本国内に輸入された柑橘類からの残留イマザリルに関する報告は多く、これに対応すべく迅速且つ簡便なイマザリルの残留分析法の開発が要求されている。従来より、イマザリルは、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた方法により、分析が行われている。しかし、この分析法では、HPLC 分析を行うまでの抽出、クリーンアップ等の試料調製が多段階

免疫化学的測定(ELISA)法は、簡便且つ迅速に農薬を測定できる方法として近年、注目されている。本研究では、検出頻度の高いレモン、オレンジ及びグレープフルーツを用いたイマザリルの ELISA 法の条件検討を行い、有用な知見を得たので報告する。

B. 研究方法

B-1. 精製抗体の作製方法

直接競合阻害 ELISA に必要な精製抗体を得るために、抗イマザリルモノクローナル抗体産生細胞を用いてマウス腹水を作製した。

予め Pristane (2,6,10,14-tetramethylpenta-decane) を腹腔内に投与したオスマウスに選抜した増殖期の抗イマザリルモノクローナル抗体産生細胞 5×10^6 個を腹腔内に注入した。約1週間後、腹部の肥大したマウスより腹水を採取した。腹水を

2,500rpm、20分間遠心し、脂質層及び血球成分以外の部分を腹水中間層として回収した。得られた腹水中間層 4mL を採取し、飽和硫安濃度が約33%となるように飽和硫安水溶液 2mL を加えて塩析した。腹水を攪拌しながら、飽和硫安水溶液をゆっくりと添加し、硫安と腹水中間層の混合液を 4 °C、10,000rpm で 20 分間遠心した。遠心後、沈殿物を回収し、10mM リン酸塩緩衝液(PBS、pH7.2)1mL に溶解した。更に、一晚、4 °C、PBS で透析し、精製抗体を得た。抗体濃度は、精製 IgG 1mg/mL の 280nm における吸光度 1.4 を吸光係数として用いて算出した。

B-2. 西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合イマザリルハプテンの作製方法

標識酵素として用いた西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とイマザリルハプテンを活性化エステル法に基づき調製した。イマザリルハプテン 0.2mmol を秤量し、ジメチルホルムアミド(DMF)1mL に溶解した。N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)及びジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)をそれぞれ 0.2mmol 秤量し、先の DMF 溶液に添加後、室温にて 4 時間反応させた。反応後、遠心にて沈殿物と分離し、上清のみを回収した(1液)。HRP 25mg を秤量し、PBS 2.5mL に溶解した。HRP 溶解液に DMF 525 μ L をゆっくりと加え、十分に攪拌した(2液)。次に、1液 125 μ L を 2液に滴下し、その後、4 °Cにて 16 時間反応させた。反応終了後、PBS にて透析し、溶液を回収した。HRP 結合イマザリルハプテン濃度は、HRP 1mg/mL の 403nm における吸光度 2.275 を吸光係数として用いて算出した。

B-3. 直接競合阻害 ELISA

イマザリル濃度を測定するために、HRP 結合イマザリルハプテン及び抗イマザリルモノクローナル抗体を用い、直接競合阻害 ELISA を行った。B-1 で得られた精製抗イマザリルモノクローナル抗体を 10mM PBS で 10 μ g/mL に希釈し、96 ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークラ

イト社製)に 50 μ L/ウェルで添加し、一晚、4 °Cにて固相化した。固相化後、希釈液を捨て、ブロッキング溶液(大日本製薬社製液状ブロックエースを蒸留水で 4 倍に希釈して使用)を 300 μ L/ウェルで添加し、一晚、4 °Cにてブロッキング処理した。

メタノールに溶解した各濃度のイマザリル 50 μ L と 10mM PBS 450 μ L を混和し、PBS で希釈した HRP 結合イマザリルハプテン溶液 500 μ L を添加した混合液を試験液とした。この試験液を 50 μ L/ウェルで添加し、25 °C、1 時間反応させた。反応終了後、PBS で 5 回洗浄(B/F 分離)し、2mg/mL *o*-フェニレンジアミンと 0.02% 過酸化水素を加えた 0.1M リン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)を 50 μ L/ウェルで添加し、室温にて 10 分間、発色させた。発色後、0.5M 硫酸により反応を停止させ、490nm の吸光度で測定することにより柑橘類中のイマザリル濃度を求めた。

B-4. ELISA 用柑橘類抽出液の調製方法

破碎した各種柑橘類 10g を採取し、これにメタノール 20mL を加え、1 時間振盪抽出した。抽出後、吸引ろ過、更に、自然ろ過し、得られた抽出液をメタノールで 50mL に定容した(5 倍希釈)。抽出液を PBS で 10 倍に希釈したものを被験液として直接競合阻害 ELISA に供した。

B-5. HPLC 用柑橘類抽出液の調製方法

破碎した各種柑橘類 20g を採取し、これに 1M 水酸化ナトリウム 5mL 及びアセトン 100mL を加えて、30 分間振盪抽出した。振盪後、吸引ろ過し、残渣にアセトン 50mL を加え、先のろ液に合わせた。このろ液を減圧濃縮後、得られた濃縮液を Chem Elut ケイソウ土カートリッジに負荷し、酢酸エチル 100mL で溶出した。この溶出液を減圧濃縮後、硫酸転溶により、イマザリルを硫酸相に移し、得られた硫酸相を *n*-ヘキサンで洗浄した。硫酸相に 1M 水酸化ナトリウム 10mL を加え、酢酸エチル転溶によりイマザリルを酢酸エチル相に移し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ろ過し、酢酸エチルを減圧除去した。残留物をメタノ

ール-水(8:2v/v)に溶解し、5mL に定容したものを HPLC 分析に供した。HPLC 測定条件を Table 1 に示した。

C. 研究結果

C-1.メタノールによる抗イマザリルモノクローナル抗体への影響

イマザリルの水に対する溶解度は、20 °Cにおいて 0.18g/L、メタノールでは、500g/Lであり、水に対して難溶である。柑橘類からの抽出においては、水では、イマザリルが殆ど抽出されず、メタノールのような有機溶媒による抽出操作が必要である。本節では、抽出溶媒として、メタノールを選択し、メタノールが抗イマザリルモノクローナル抗体の有する直接競合阻害 ELISA の感度に与える影響に関して検討した。固相化濃度を 10 μ g/mL、緩衝液として 10mM PBS、HRP 結合イマザリルハプテンの最終濃度を 15.625ng/mL になるよう調製し、反応を 1 時間、25 °Cで行い、メタノール最終濃度を 1、5、10、20 及び 30%として検討した際に得られた標準曲線を Fig.1 に示す。

Fig.1 よりメタノール最終濃度が 1 ~ 20%においては、十分な吸光度が得られたが、30%とした場合、著しく吸光度が低下し、反応性の減少が認められた。それぞれの濃度における抗イマザリルモノクローナル抗体が示した 50%阻害率(IC₅₀)は、1 ~ 10%においては、2 ~ 6ng/mL、20%においては、15ng/mL、30%においては、80ng/mLであった。これより、メタノールの最適添加濃度を 10%以下とした。

C-2. 柑橘類抽出液の直接競合阻害 ELISA への影響

レモン、オレンジ及びグレープフルーツ抽出液を調製し、各種柑橘類抽出液の直接競合阻害 ELISA への影響に関して検討した。

メタノール及び各種柑橘類抽出液に既知濃度のイマザリルを添加し、直接競合阻害 ELISA を

行なった。標準溶液及び抽出液の反応曲線は良く一致した(Fig.2)。また、阻害曲線を検討したところ、イマザリル標準溶液と各種抽出液の阻害曲線は、ほぼ一致していた(Fig. 3)。なお、Fig. 2 には、グレープフルーツ、Fig. 3 には、オレンジのみをそれぞれ示した。

C-3.直接競合阻害 ELISA と HPLC との相関性試験

前述の条件を用いて、HPLC との相関性を検討した。濃度レベルを 0.05 ~ 6ppm とし、相関性を検討した。レモンでは、ELISA と HPLC との間の相関係数(r)が 0.996、傾きが 0.893、オレンジでは、r が 0.997、傾きが 0.805、グレープフルーツでは、r が 0.997、傾きが 0.98 となり、双方の間には、高い相関関係が認められた(Fig. 4)。

D. 考察

輸入農産物の増大に伴い、農産物中に残留する農薬を迅速且つ簡便に分析する方法の開発が急務とされている。イマザリルは、輸入柑橘類、特にレモン、オレンジ及びグレープフルーツからの検出率が高い。本研究の ELISA による分析方法は、重要性の高いものと考えている。

本研究で確立した直接競合阻害 ELISA の有用性を従来法の HPLC 分析とクロスチェック試験した結果、3 種柑橘類ともに、両者の間には、高い相関関係が認められた。

これらの知見より、本研究で開発したイマザリルの ELISA 分析は、柑橘類、特に、イマザリルの残留頻度が高い輸入レモン、オレンジ及びグレープフルーツへの適応に有用性が高いと考えられた。

E. 結論

輸入農産物の増大に伴い、迅速且つ簡便な残留農薬分析法の開発が急務とされている。本研究では、輸入柑橘類からの検出頻度の高いイマザリルを簡便且つ迅速に分析できる分析方法の開発を

目的に、ELISA の条件検討を試みた。抽出液を直接、分析に供することができる ELISA は、その分、抽出液中の柑橘類成分の妨害を受けやすいことが知られているが、本研究においては、良好な結果を得ることが出来た。確立した ELISA 分析条件を用い、従来からイマザリルの理化学的試験法として使用されている HPLC との相関性を検討した。3 種柑橘類ともに、両者の間には、高い相関関係が得られた。

以上の結果から、本法は、有用性が高い分析方

法であることが示唆された。今後、本分析法を用い、市販農産物への適応を検討し、実用化に向けたイマザリルの ELISA の確立を行う必要があると考えている。

F. 研究発表

本研究の一部の内容は、第 76 回日本食品衛生学会 学術講演会(1998 年 11 月、新潟)において発表した。

Table 1 Analytical conditions for HPLC

Pump : NANOSPACE SI-1 (SHISEIDO)

Column : J'sphere ODS-H80 (YMC, 4.6mm i.d. x 150mm)

Detector : UV

Wavelength : 230 or 202nm

Mobile phase : Methanol / Water (8:2 v/v)

Flow rate : 1.0mL/min

Injection volume : 10 μ L/min

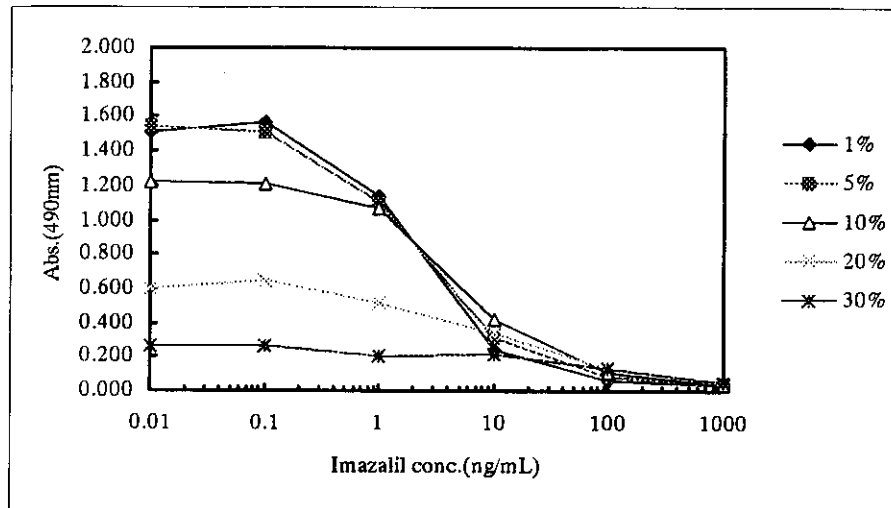


Fig. 1 Methanol tolerance test for anti-imazalil monoclonal antibody

ELISA condition

Immobilized conc. : 10 μ g/mL, Buffer : 10mM PBS (pH 7.2)

HRP conc. : 15.625ng/mL, Reaction : 1 hour, 25 $^{\circ}$ C

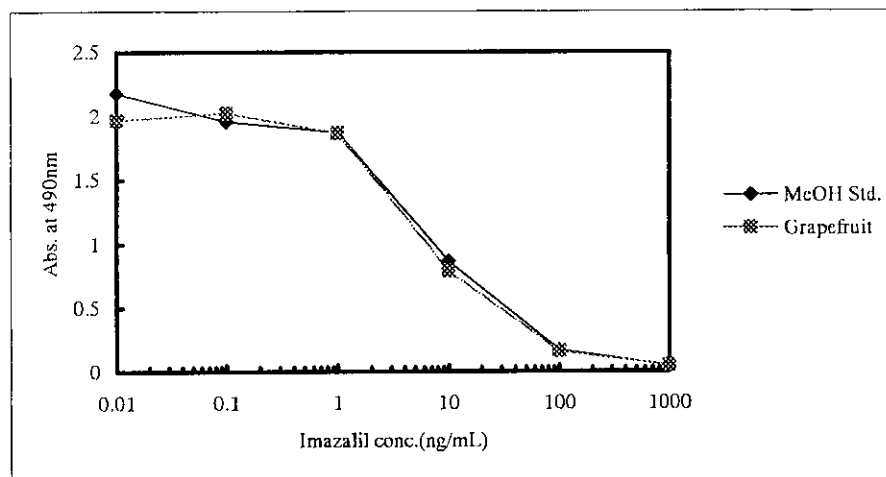


Fig. 2 Standard curve for imazalil with grapefruit extract
ELISA conditions

Immobilized conc. : 10 μ g/mL, PBS : 10mM PBS (pH 7.2)

Methanol conc. : 5%, HRP : 15.625ng/mL

Reaction : 1 hour, 25 $^{\circ}$ C

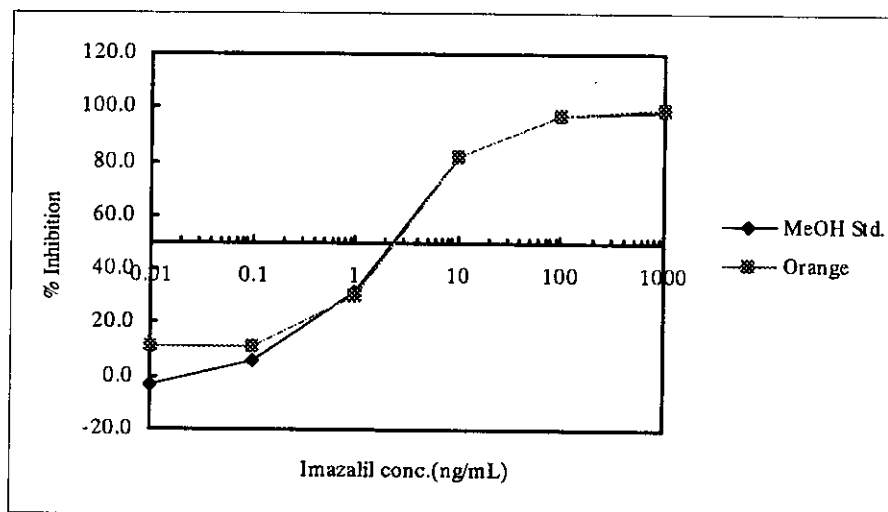


Fig. 3 Inhibition curve for imazalil with orange extract

ELISA condition

Immobilized conc. : 10 μ g/mL, Buffer : 10mM PBS (pH 7.2)

Methanol conc. : 5%, HRP conc. : 15.625ng/mL

Reaction : 1 hour, 25 $^{\circ}$ C

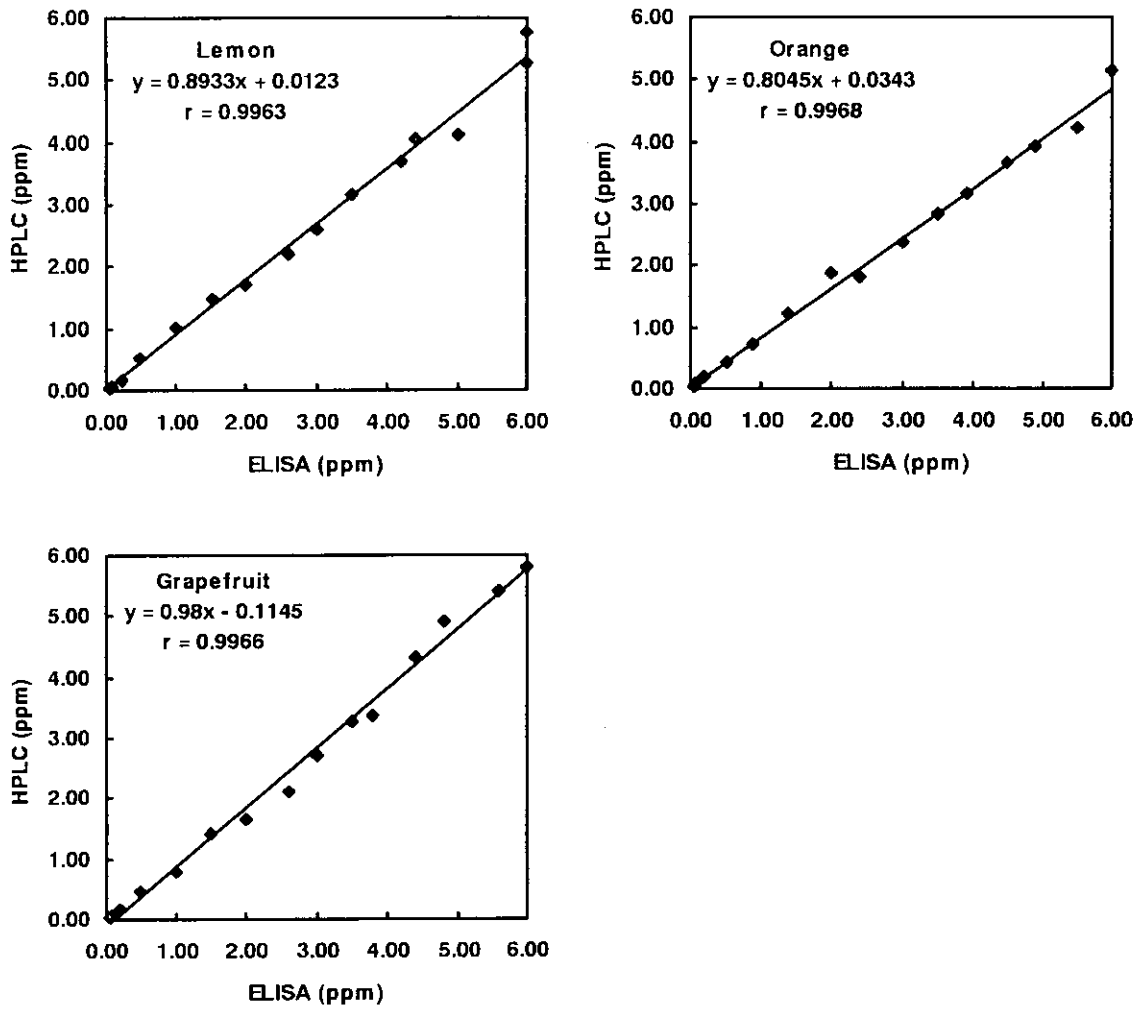


Fig. 4 Relationship between ELISA and HPLC

分担研究報告書

農薬免疫アッセイと機器分析の比較評価に関する研究
(2) ピリミカーブの残留分析のための免疫化学的
測定法の開発

分担研究者 中澤 裕之

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

農業イムノアッセイと機器分析の比較評価に関する研究 (2) ピリミカーブの残留分析のための免疫化学的測定法の開発

分担研究者 中澤 裕之 星薬科大学教授

研究要旨

カーバメート系殺虫剤であるピリミカーブについて免疫化学的分析法の開発を行った。本研究においては、ヘテロログスなELISA測定系が、高感度化のための技術として有用な手法であることを例証するとともに、ピリミカーブの残留分析に応用可能なELISA法の基礎を構築した。

研究協力者

竹脇 俊一 株式会社ヤトロン

テン（表1）と西洋ワサビペルオキシダーゼ（POD）を結合させ、酵素標識化ハプテンを調製した。

A. 研究目的

カーバメート系農薬であるピリミカーブは、例えば殺虫剤「ピリマー水和剤」の主成分であり、アブラムシに即効的に効き、有機リン系の殺虫剤に抵抗性のアブラムシにも有効である。リンゴ、モモ、ウメ、ミカン、キュウリ、ナス、トマト、ダイコン、キャベツ、ジャガイモ、バラ、キク、タバコと幅広い作物で、防除のために散布されており、農産物の生産現場はもとより流通途上において迅速な残留分析が望まれていることから、イムノアッセイ開発研究の対象として取り上げた。

まず、ピリミカーブハプテンを各々 $3.5\mu\text{mol}$ ジメチルスルホキシド（以下DMSO） $50\mu\text{l}$ に溶解した。次にこれらの溶液にN-ヒドロキシコハク酸イミド（ $5\mu\text{mol}$ ）をDMSO $10\mu\text{l}$ に溶解して添加後、さらに1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（ $4\mu\text{mol}$ ）をDMSO $20\mu\text{l}$ に溶解し、添加した。室温にて1.5時間反応させた。この反応溶液に85mMホウ酸緩衝液（pH8.0） $500\mu\text{l}$ に溶解したPOD 10mgを添加し、再び室温にて1.5時間反応させた。反応終了後、ダルベッコのリン酸緩衝液（以下PBS(-)と略す）に対し 4°C 、一晚透析し、ピリミカーブとPODとの結合体を各々調製した。

B. 研究方法

B-1. ピリミカーブハプテンの構造

測定法の開発に使用した各ハプテンの構造を表1に示す。

抗体作製のためタンパク質に結合して免疫原として用いたハプテンはEIT-27である。

B-2. 酵素（ペルオキシダーゼ）結合ハプテンの作製

活性エステル法により、ピリミカーブハブ

B-3. ボックスタイトレーション

モノクローナル抗体（PMC27-29）を種々の濃度でPBS(-)に溶解し、96ウエルのマイクロタイタープレートに $100\mu\text{l}$ で添加後、 4°C で1晩静置することにより、固相化した。次に $300\mu\text{l}$ /ウエルでブロッキング緩衝液 {1%BSAと60mM NaClを添加した85mMホウ酸緩衝液（pH8.0）} に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。このウエルを洗浄液（60mM NaClを添加

したホウ酸緩衝液)で洗浄した後、B-2で作製したピリミカーブハプテンのPOD標識体の希釈液を100 μ l/ウェルに加え、室温で1時間反応した。洗浄液で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質溶液 {3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(100 μ g/ml)、0.006%過酸化水素を添加した0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5)} で10分間発色させ、1N硫酸で反応停止後、450nmの吸光度を測定した。

B-4. モノクローナル抗体(PMC27-29)の精製

まず、抗体産生ハイブリドーマをダルベッコ/10%FBS (牛胎児血清) 培地を用いて培養した。その培養上清に50%飽和となるように硫酸を加え、4 $^{\circ}$ Cで1晩攪拌した。生じた沈殿物に蒸留水を加えて可溶化した後、PBS(-)で透析し、Avid ALゲル (バイオプローブ インターナショナル社) からイムノクロマトグラフィによって精製した。

B-5. 直接競合阻害ELISA法

直接競合ELISA法は以下の手順で実施した。精製したモノクローナル抗体PMC27-29を4 μ g/mlの濃度で50mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.3)に溶解し、96ウェルのマイクロタイタープレートに100 μ l/ウェルで加えた後、4 $^{\circ}$ Cで1晩静置することにより固相化した。次に、300 μ l/ウェルでブロッキング緩衝液 {1%BSAと60mM NaClを添加した85mMホウ酸緩衝液(pH8.0)} に置き換え、室温で1時間ブロッキングした。

また、このプレートとは別に各々60mM NaClを添加した85mMトリス緩衝液 (pH8.0) で適当な濃度に希釈したピリミカーブ溶液とペルオキシダーゼ結合ハプテンを混合し、ブロッキングしたプレートに100 μ l/ウェルで加えた後、室温にて1時間反応した。洗浄液 (60mM NaClを添加したホウ酸緩衝液) で3回洗浄した後、ペルオキシダーゼの基質溶液で発色させ、450nmの吸光度を測定した。

C. 研究結果

C-1. ボックスタイトレーションによる抗体固相化量とペルオキシダーゼ結合ハプテン量の決定

図1にボックスタイトレーションの結果を示す。モノクローナル抗体PMC27-29を1 μ g/ml~8 μ g/mlの範囲でpH8.3 (炭酸緩衝液) の条件で固相化し、それに対するPOD-EIT27の反応性を調べ、固相化抗体量とPOD-ハプテン量の至適量を求めた。

抗体量は4 μ g/ml以上でプラトーに達し、測定系では吸光度2前後のブランク値が好ましいことから、POD-ハプテン量は0.3 μ g/ml~1.0 μ g/mlの濃度範囲が適当と認められた。

C-2. ヘテロロガスな直接競合阻害ELISA法による感度の比較

酵素 (POD) 標識ハプテンとして用いるハプテンの種類を変え (表1)、測定系の高感度化を試みた。免疫原に用いたEIT27より、側鎖構造を異にした類縁化合物EIT135を用いた方が、約3倍から5倍検量線が高感度側にシフトし、測定系の増感を図ることができた (図2)。

従って、酵素標識化ハプテンとしてはPOD-EIT135を用いることとした。なお、EIT134とEIT140についてはEIT26と同程度であった。

C-3. POD-EIT135を用いた反応条件

ハプテンとしてEIT135を用いた場合の酵素標識化ハプテンの濃度と抗体固相化量を再度求めた。前記の結果 (C-1) より抗体固相化量を4 μ g/mlとした条件で、0.3 μ g/mlと0.6 μ g/mlの酵素標識化ハプテン量を比較した。結果を図3に示す。吸光度2付近のブランク値を示す0.3 μ g/mlを至適濃度として選定した。

C-4. 直接競合ELISA法におけるpHの影響

反応条件としてpH依存性を調べた (図4)。pH5~pH10までの検討結果、pH8とpH9のトリス塩酸緩衝液 (150mM NaClを含む100mMトリス緩衝液) が最も反応性が高かった。中性により

近い反応条件がよいと考え、pH8を反応pHとして採用した。

C-5. 直接競合ELISA法におけるメタノールの影響

図5は、酵素標識化ハプテンとしてPOD-EIT135を用いた場合の直接競合ELISA法のメタノール耐性を示す。メタノール濃度の上昇に伴い、吸光度の減少および測定範囲のシフトがやや認められるが、10%程度まで使用可能と考えられ、これを測定条件とした。

C-6. ピリミカーブおよびその類縁化合物との交差反応性

モノクローナル抗体PMC27-29を用いた直接競合阻害ELISA法（酵素標識化ハプテン：POD-EIT135）のピリミカーブおよびその類縁化合物との交差反応性を比較検討した。反応性は、これらの化合物未添加時の吸光度を50%阻害する濃度を各々IC50値として、表2に示した。代表的な関連化合物の中ではピリミカーブにほぼ特異的（IC50：34ng/ml）であった。

D. 考察

直接競合阻害ELISA法を構築するのに、ヘテロロガスな測定系、すなわち抗体作製のために用いた免疫用ハプテンと構造類似の化合物を酵素標識用のハプテンとして用いることが、測定系の感度を高める上で非常に有用な手法であることを本研究で例証した。これは、酵素標識用ハプテンを選択する際に、抗体との

親和性が免疫に用いたハプテンよりもやや低くなるような化合物を酵素標識用ハプテンとして選択することで、抗体による認識が低下し、平衡状態が抗体-測定対象物質（抗原）複合体へとシフトし、その結果、抗体と酵素標識化ハプテンとの会合が抑えられて感度増大をもたらすものと考えられる。

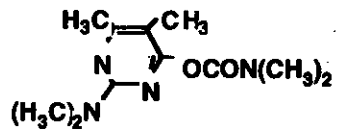
これにより、野菜・果実等の農産物における残留基準値から見て、ピリミカーブの残留分析への応用が可能な免疫化学的測定系の基盤が整った。

E. 結論

ピリミカーブを免疫化学的に測定することを目的として、モノクローナル抗体を用いた直接競合阻害ELISA法の基盤研究を行った。免疫抗原に用いたハプテンを酵素標識化ハプテンとした場合、測定範囲は約5~500ng/mlであったが、構造の異なるハプテンとしたヘテロロガス法では、約3倍測定感度の上昇が認められた（約2~200ng/ml）。また直接競合阻害ELISA法によるピリミカーブおよびその類縁化合物に対する交差反応性の検討では、ピリミカーブに対する特異性の高さが確認された。食品衛生法に基づくピリミカーブの残留基準値が果物・野菜で0.5~5ppmであるため、本測定系での応用が可能と考えられる。

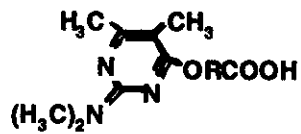
表1 ピリミカーブに対するハプテンの構造

pesticide



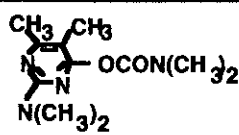
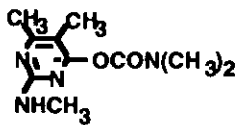
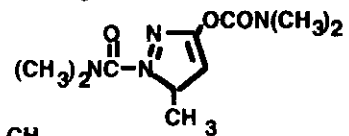
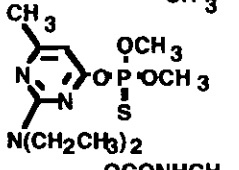
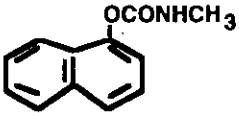
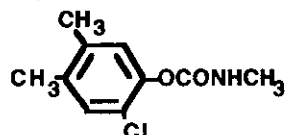
pirimicarb

hapten



EIT0027	R=CH ₂
EIT0135	R=(CH ₂) ₅
EIT0026	R=CH ₂ CONH(CH ₂) ₃
EIT0134	R=CH ₂ CONH(CH ₂) ₅
EIT0140	R=CH ₂ CONCH ₂ (CH ₂) ₃
EIT0149	R=CO(CH ₂) ₄

表2 ピリミカーブおよびその関連化合物との交差反応性

農薬名	構造式	IC ₅₀ (ng/ml)	
		EIT27	EIT135
ピリミカーブ		73	34
ピリミカーブデメチル		9000	4000
ジメチラン		32,000	19,000
ピリミホスメチル		>100,000	35,000
カルバリル		>100,000	>100,000
カーバノレート		>100,000	>100,000