

論 文

アセトニトリル抽出液を用いた ELISA キットによる トマト中のエマメクチン安息香酸塩の定量法

白木康一，東倉祥子，多田裕之，永井宏幸，出屋敷喜宏

要 旨

平成18年5月に施行されたポジティブリスト制度に伴い規制対象農薬が増加するに至り，多数の農薬について効率的で簡易かつ迅速な分析が必要とされている。

市販ELISAキットの実用性能を確認することを目的として，アセタミプリド，クロルフェナピル及びフルトラニルについて機器分析法と比較検討した。また，多成分残留農薬分析の適用が困難なエマメクチン安息香酸塩について，アセトニトリル抽出液（多成分残留農薬分析法の抽出液）を試料として利用するELISAを検討した。

機器分析とELISAとの相関性は，アセタミプリドで相関係数 $r^2=0.995$ ，回帰直線式 $y=0.997x+0.014$ ，クロルフェナピルで $r^2=0.997$ ， $y=0.983x+0.011$ ，フルトラニルで $r^2=0.998$ ， $y=1.041x-0.020$ と良好な相関が得られた。

アセトニトリル抽出液を試料として用いたエマメクチン安息香酸塩のELISA試験での添加回収試験の回収率は，82.3～95.6%，それぞれのCV値も3.6～7.6%と良好な結果が得られた。このことから本法は，多成分分析と併用するスクリーニング検査として有用であることが確認された。

キーワード：残留農薬，ELISA，エマメクチン安息香酸塩，多成分残留農薬分析

1 はじめに

近年，食の安全性，特に農産物中の農薬の残留性に対する関心は，ますます高くなってきている。また食品衛生法による規制農薬数は，年々増加し，残留農薬のポジティブリスト制度が平成18年5月29日から施行されるに至ったことから，食品の安全性，適正な市場流通，生産現場における農薬の適正使用確保のために，農産物中の残留農薬の効率的で簡易かつ迅速な分析が必要とされている。

残留農薬分析は，GC/MSやLC/MS等による多成分残留農薬分析法が主流で，本分析法を適用できない農薬については個別分析法で対応している。該当の農薬それぞれに個別分析法で対応するには相当の時間や技術を要することから，多検体を簡易かつ迅速に分析できるELISAのスクリーニング検査への活用が期待されている。我々は，単一濃度ではあるが数種の農産物を用いて，市販ELISAキットと機器分析法との相関性を比較検討し良好な結果が得られたことを報告している¹⁾。

また市販ELISAキットによる残留農薬測定法の有用性及び問題点等を検討した報告もされている^{2～4)}。今回，アセタミプリド，クロルフェナピル，フルトラニルについてトマトを用いて数種の濃度でELISAおよび機器分析による定量を行った結果，良好な相関性を確認した。多成分残留農薬分析の適用が困難なエマメクチン安息香酸塩について，アセトニトリル抽出液を試料として用い，迅速で簡易な市販ELISAキットによる分析法を検討したところ，良好な結果が得られたので報告する。

2 試料及び方法

2.1 試料

トマト（市販品）

2.2 試薬及び標準溶液

n-ヘキサン，アセトニトリル，アセトン，シクロヘキサン，メタノール及び酢酸エチルは，関東化学(株)製残留農薬用を用いた。

硫酸ナトリウム，塩化ナトリウム及びセライト

545は、関東化学(株)製特級を用いた。

農薬標準品のアセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニルは、林純薬工業(株)を所定の濃度に調製して標準溶液として用いた。

農薬標準品のエマメクチンは、林純薬工業(株)のエマメクチン安息香酸塩を所定の濃度に調製して標準溶液として用いた。

固相抽出用カラムは、スペルコ社製のENVI-Carb/NH₂及びウォーターズ社製のSep-Pakシリカゲルを用いた。

ELISAキット（アセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニル、エマメクチン安息香酸塩の各農薬用）は、ホリバ・バイオテクノロジー(株)製を用いた。

2.3 装置及び測定条件

GC：アジレント社製GC6890（NPD）、HP-5カラム(0.32 mm id × 30 m, 0.25 μm), カラム温度プログラム50℃-(20℃/min) 200℃-(10℃/min)-290℃(5 min), 注入口温度200℃, 検出器温度310℃, キャリアーガス流量1 mL/minの測定条件で行った。

LC/MS：アジレント社製1100 SL LC/MSD, カラム Inertsil ODS 3 (150mm, 3 mm, 5 μm), カラム温度40℃, 移動相アセトニトリル+5 mM酢酸アンモニウム水溶液(15:85)→(100:0)/20min, 流速0.2 mL/minの測定条件で行った。

GPC：島津製作所製LC10ATシステムを使用した。

ELISA：(株)ホリバ・バイオテクノロジー製のアセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニル、エマメクチン測定用の各キットを用いた。測定、定量方法はキット指定の方法に従った。

2.4 試料溶液の調製

2.4.1 アセタミプリドの試料溶液の調製

トマトを細砕後、その5 gを遠心管に秤採り、予め0.5~5.0 μg/mLに調製した標準溶液をそれぞれ1 mL添加する。これにメタノール25 mLを加え30分間振とう抽出を行い、ろ過後メタノールにて50 mLに定容し、LC/MS測定の試料とする。またその1 mLを採り、水を加えて10 mLに定容したものをELISAの試料溶液とする。

2.4.2 クロルフェナピルの試料溶液の調製

トマトを細砕後、その5 gを遠心管に秤採り、予め1.0~5.0 μg/mLに調製した標準溶液をそれぞれ1 mL添加する。これにメタノール25 mLを加え30分間振とう抽出を行い、ろ過後メタノールにて50 mLに定

容する。メタノール抽出溶液10 mLを梨型フラスコに採り減圧濃縮後、アセトン／n-ヘキサン（1：1）で2 mLに定容する。これをSep-Pakシリカゲルの下にENVI-Carb/NH₂を付したカラムに注ぎこれを流出させた後、アセトン／n-ヘキサン（1：1）20 mLで溶出する。溶出液を減圧濃縮後、アセトンで1 mLに定容し、GC（NPD）分析用試料溶液とする。また先のメタノール抽出溶液1 mLを採り、水を加えて10 mLに定容したものをELISAの試料溶液とする。

2.4.3 フルトラニルの試料溶液の調製

トマトを細砕後、その5 gを遠心管に秤採り、予め1.0~5.0 μg/mLに調製した標準溶液をそれぞれ1 mL添加する。これにメタノール25 mLを加え30分間振とう抽出を行い、ろ過後メタノールにて50 mLに定容する。以下2.4.2のクロルフェナピルと同様の操作を行い、GC(NPD)分析用試料溶液とする。また先のメタノール抽出溶液1 mLを採り、水を加えて10 mLに定容したものをELISAの試料溶液とする。

2.4.4 エマメクチン安息香酸塩の試料溶液の調製

トマトを細砕後、その20 gをビーカーに秤採り、予め1.0~4.0 μg/mLに調製した標準溶液をそれぞれ1 mL添加する。以下の操作を当所で採用している分析法（図1）に従い操作する。すなわち粉碎した試料にアセトニトリル150 mLを加え、ホモジナイザーにて3分間攪拌抽出する。セライト545を厚さ1 cm載せたロートを付した200 mLのメスシリンダー中へ吸引ろ過した後、200 mLに定容する。このろ液の1 mLを採り、蒸留水で10 mLに定容したものをELISA用試料溶液とする。

2.4.5 アセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニル及びエマメクチン安息香酸塩の定量

2.3の装置及び測定条件で示したGC(NPD)、LC/MS、ELISAキットの条件でアセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニル及びエマメクチンの標準溶液で検量線を作成し、その検量線を用いて、試料中のアセタミプリド、クロルフェナピル、フルトラニル及びエマメクチン安息香酸塩濃度を求めた（図1）。

3 結果及び考察

3.1 アセタミプリド、クロルフェナピル及びフルトラニルの添加回収試験及び機器分析とELISAの相関性

添加回収試験は、アセタミプリドについては試料5 gに標準溶液をそれぞれ0.5~5.0 μg添加し、クロルフェナピル及びフルトラニルについては試料5 gにそれぞれ1.0~5.0 μg添加した試料について行った。そ

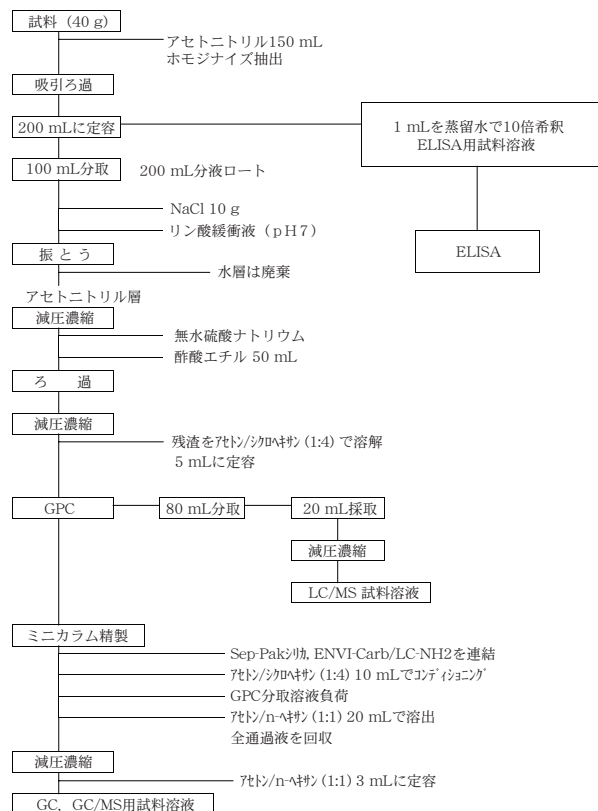


図1 多成分残留農薬分析法

の結果を表1～3に示した。3農薬とも機器分析及びELISAでの測定結果は、77.2～102.5%と良好な添加回収率が得られた。

これらの結果に基づいて、アセタミプリド、クロルフェナピル及びフルトラニルの機器分析とELISAのそれぞれの相関性を検討した結果を図2～4に示した。アセタミプリドに関するELISAとLC/MSによる分析結果の相関は、相関係数 0.995、回帰直線式 $y=0.997x+0.014$ と良好な相関が得られた(図2)。また、クロルフェナピル及びフルトラニルにおいても、それぞれ相関係数0.997及び0.988、回帰直線式 $y=0.983x+0.011$ 及び $y=1.041x-0.020$ と、ELISAとGCによる分析結果には良好な相関が認められた(図3、図4)。これらの結果から、アセタミプリド、クロルフェナピル及びフルトラニルのELISAによる農薬分析の有用性が確認された。

3.2 エマメクチン安息香酸塩ELISAキット測定に及ぼす抽出溶媒の影響

ELISA分析キットの使用方法では分析にメタノール10%となる試料の使用を定めていることから、この溶媒をアセトニトリル10%に置換した場合の影響を検討した。抽出溶媒メタノールの場合に1試料で0.701ppbと若干低い値を示したが、それ以外の2試料については良好な結果が得られ、ELISA試験の溶

表1 アセタミプリドの LC/MS 及び ELISA における添加回収試験結果

n=2							
分析法	添加量 (μg/g 試料)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1
LC/MS	測定平均値 (μg/g 試料)	0.945	0.739	0.528	0.367	0.171	0.092
	平均回収率 (%)	94.5	92.3	88.1	91.7	85.6	92.0
ELISA	測定平均値 (μg/g)	0.936	0.714	0.538	0.336	0.154	0.09
	平均回収率 (%)	93.6	89.2	89.6	83.9	77.2	90.0

表2 クロルフェナピルの GC/NPD 及び ELISA における添加回収試験結果

n=2							
分析法	添加量 (μg/g 試料)	1.0	0.8	0.5	0.4	0.3	0.2
GC/NPD	測定平均値 (μg/g 試料)	0.962	0.707	0.487	0.377	0.259	0.182
	平均回収率 (%)	96.2	88.4	97.4	94.3	86.2	91.0
ELISA	測定平均値 (μg/g)	0.967	0.710	0.486	0.362	0.256	0.178
	平均回収率 (%)	96.7	88.8	97.2	90.5	85.2	89.2

表3 フルトラニルの GC/NPD 及び ELISA における添加回収試験結果

n=2							
分析法	添加量 (μg/g 試料)	1.0	0.8	0.5	0.4	0.3	0.2
GC/NPD	測定平均値 (μg/g 試料)	0.946	0.767	0.436	0.396	0.276	0.190
	平均回収率 (%)	94.6	95.8	87.1	99.0	91.8	94.6
ELISA	測定平均値 (μg/g)	0.921	0.752	0.474	0.410	0.272	0.190
	平均回収率 (%)	92.1	94.0	94.7	102.5	90.7	95.1

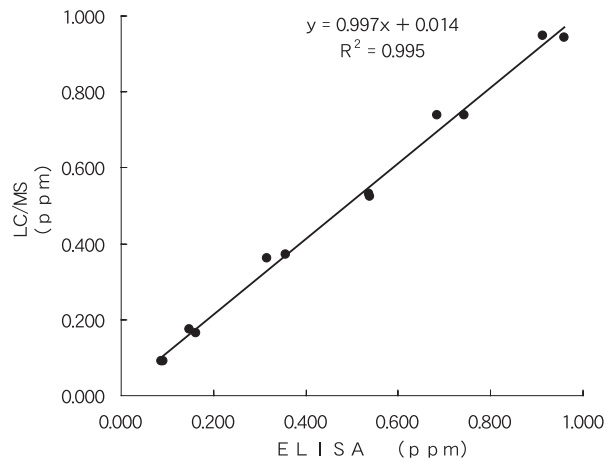


図2 アセタミプリドにおけるLC/MSとELISAの相関

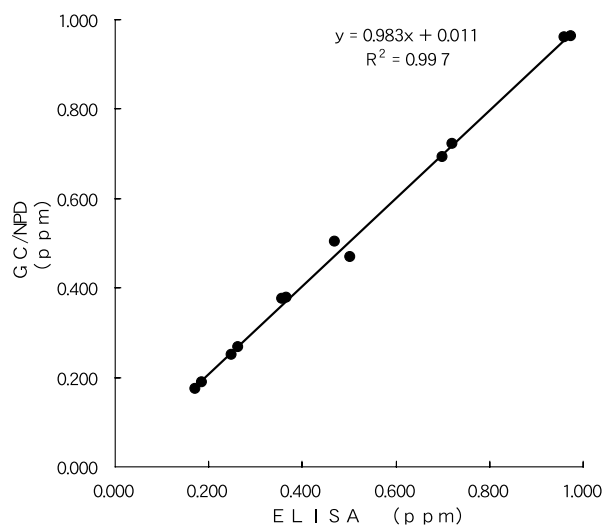


図3 クロルフェナピルにおけるGC/NPDとELISAの相関

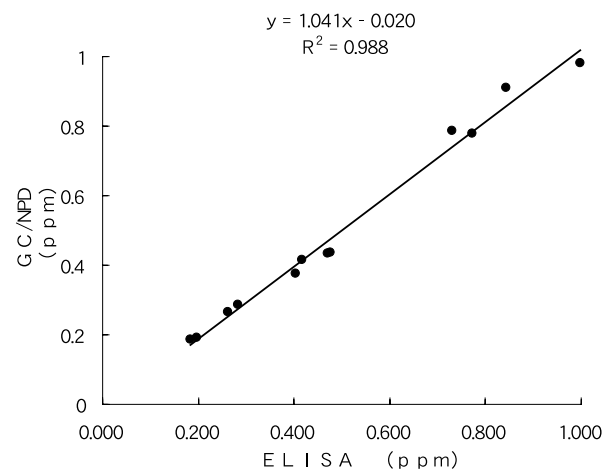


図4 フルトラニルにおけるGC/NPDとELISAの相関性

媒にメタノールとアセトニトリルのいずれを使用した場合でも添加回収率に有意な差は見られなかった(表4)。このことから、10%アセトニトリル抽出試料はELISAに利用可能であることが判明した。

表4 エマメクチン安息香酸塩 ELISAキット測定に及ぼす抽出溶媒の影響

n=3		
測定濃度	メタノール抽出試料 測定値 (ppb)	アセトニトリル抽出試料 測定値 (ppb)
1 ppb	0.701	1.036
1 ppb	0.962	0.918
1 ppb	0.969	0.914
平均値	0.878	0.956
CV (%)	17.4	7.2

3.3 エマメクチン安息香酸塩の添加回収試験

まず、試料20gに対しエマメクチン安息香酸塩1.0、2.0および4.0 μg を添加してアセトニトリル抽出し、ELISA測定用に調製した各濃度の抽出試料について、3例から4例の添加回収試験を行った。添加回収試験の回収率は、82.3%~95.6%と良好な結果が得られ、それぞれのCV値も3.6~7.6%と許容される範囲であった(表5)。

表5 マメクチン安息香酸塩 ELISAキットによる添加回収試験結果

添加量 (μg)	1.0	2.0	4.0
最終濃度 (ppb)	0.5	1.0	2.0
実測値平均 (ppb)	0.45	0.96	1.65
平均回収率 (%)	89.2	95.6	82.3
CV (%)	3.6	7.2	7.6
検体数 (n)	n=4	n=3	n=3

本法では、エマメクチン安息香酸塩について残留濃度0.05ppm程度が測定可能であった。エマメクチンのトマトにおける残留基準値が0.1ppmであることから、本法は、多成分分析と併用するスクリーニング検査として有用であることが示された。またエマメクチンのアミノ体等についても今後検討を行いたい。更にキットを用いて多種の農産物について定量性及びマトリックスの影響の有無等についても検討を重ねる予定である。

今後、多成分残留農薬分析法の適用し難い農薬について、更にELISAキットの開発が成されれば、現在行っている一系統の抽出操作で得られた試料を用い、他の機器分析法と組み合わせることにより系統的な残留農薬の迅速な多成分残留農薬分析法の確立の可能性もあり、今後の検討課題である。

文 献

- 1) 永井宏幸, 東倉祥子, 白木康一, 中屋謙一: 農産物中の残留農薬分析における酵素免疫学的測定法

- (ELISA) と機器分析との相関性について, 日本食品衛生学会第88回学術講演会講演要旨集, 48, 2004.
- 2) 天野昭子, 矢野秀治: 農産物中の残留イミダクロプリドの分析における市販ELISAキットの実用性能評価, 日本農薬学会誌, 30, 249-253, 2005.
- 3) 天野昭子, 矢野秀治: フェニトロチオンおよびイミダクロプリド測定用ELISAキットにおけるキユウリのマトリクス効果について, 日本農薬学会誌, 31, 425-430, 2006.
- 4) 渡辺栄喜, 馬場浩司, 殷熙洙, 荒尾知人, 石井康雄, 上路雅子, 遠藤正造: 有機リン系殺虫剤フェニトロチオン用ELISAキットの性能評価及び果実中残留分析への応用, 日本農薬学会第30回記念大会講演要旨集, 121, 2005.

Determination of Emamectin Benzoate in Tomato Using Acetonitrile Extract with an ELISA Kit

Koichi SHIRAKI, Syoko TOKURA, Hiroyuki TADA, Hiroyuki NAGAI, Yoshihiro DEYASHIKI

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences :
1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan*

Summary

Since the pesticides as regulation objects come to increase with a positive list system enforced in May, 2006, the effective and rapid analysis is needed for the examination of a lot of pesticides. For confirming the practical utility of commercial ELISA kit for acetamiprid, chlorfenapyr and flutolanil, the instrumental analysis method and ELISA method were compared. In addition, we examined ELISA assay using acetonitrile extract (extract for a multi-residue analysis of pesticides) for emamectin benzoate which is hard to apply the multi-residue analysis for pesticides.

The correlation between ELISA and instrumental analysis was $r^2=0.995$ (coefficient of correlation), $y=0.997x+0.014$ (regression line expression) for acetamiprid, $r^2=0.997$, $y=0.983x+0.011$ for chlorfenapyr and $r^2=0.988$, $y=1.041x-0.020$ for flutolanil, respectively. High recoveries (82.3-95.6 %) and good CV values (3.6-7.6%) were provided from ELISA assay of acetonitrile extract which contains the externally added emamectin benzoate.

These results suggest that ELISA analysis is useful for screening method in combination with multi-residue analysis.

Keyword : Pesticide Residues, ELISA, emamectin benzoate, multi-residue analysis of pesticides