

農藥殘毒快速檢驗技術之研發

鄭允、高靜華、邱紀松、周桃美、李月嫦、曾佳琳

臺灣省農業試驗所應用動物系

摘要：為因應快速運銷鮮食蔬果之農藥殘毒檢驗問題，台灣省農業試驗所補充現行精密但耗時之化學檢驗技術，改依毒理學基礎，製備對農藥敏感之酵素或微生物，開發快速檢測農藥殘毒技術。該體系結合生物性探針酵素反應、光譜分析及化學薄層分析等方法，研製成功「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術，可檢驗(1)具神經毒性之殺蟲劑-有機磷及氨基甲酸鹽劑及(2)有機硫磺劑及其他數類殺菌劑。分析的層次已可由毒性之檢測，以至快速追蹤定性及定量。

快速檢驗之研發始於民國70年，係利用純化自敏感品系家蠅腦部之乙醯膽鹼酯酶(acetylcholinesterase, AChE)，經 Ellman's test 檢驗蔬果樣品中是否含有劇毒殺蟲劑之殘毒，目前可檢出前述兩大類具神經毒性藥劑(含個別藥劑達75項以上)，檢出感度可分兩段，為0.1-0.8ppm及0.8-4ppm，分別具有不同之應用性。民國78年創新完成以蘇力菌檢出殺菌劑殘毒之快速技術，除檢出有機硫磺劑外，亦適用於抗生素、銅劑等超過15種之他類殺菌劑，檢出感度為1-2ppm。以上兩項殺蟲劑及殺菌劑之檢驗技術經整合後，可在4小時內完成50件蔬果樣品之殘毒篩檢。

民國80年結合酵素反應及薄層分析法完成殺蟲劑殘毒之定性定量分析，目前已建立個別藥劑在不同溶劑展開系統之Rf值資料，可供查詢比對使用。83年則再開發快速檢出 organothiophosphates 類藥劑之技術，係於樣品萃取時添加溴水，而將有機磷之P→S轉換為P→O，大幅提高檢出敏感度，目前僅有phosphoramidates 藥劑尚因對AChE不敏感而無法快速檢出。

「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術經多年之推展，多處農會、合作社場、果菜市場及政府機關均已採用，目前全省已設置之檢驗工作站有60餘處，農試所除提供檢驗試劑外，並定期辦理檢驗人員培訓及新技術之研習。快速檢驗之國際合作方面，除新加坡及泰國之農業部已於民國80年及84年分別派員至本所研習外，農試所並接受「亞太糧食肥料技術中心」之委託，針對亞太地區七個國家之學員，於82年辦理國際「農藥殘毒快速檢驗技術」研習會，84年起並至海外進行巡迴講習，84年已於菲律賓辦理，85-87年則將繼續於馬來西亞、越南及泰國辦理技術研習，訓練各國之工作人員。此項新技術因具高度之應用性，已在亞熱帶地區蔬果種類及病蟲害繁多之國家，成為與傳統之農藥殘毒化學分析方法平行互補之新興技術。

關鍵詞：農藥殘毒、快速檢驗、殺蟲劑、殺菌劑、乙醯膽鹼酯酶、蘇力菌、薄層分析、定性定量分析。

前 言

本所百週年慶辦理之系列學術研討，植物保護部份以新科技之發展為辦理主題，因為「農藥殘毒快速檢驗」為光復以來，本所獨有之研發特色，而成為一報導單元。民國48年梁同庭先生以

務實的態度建立農藥殘毒之生物檢驗技術及體系，而在國際上首創以「殘毒預警制度」維護蔬菜安全品質⁽³⁾，此後農藥研究室一脈承襲此一立場繼續研發，將純生物性之檢驗進一步發展為結合生化及化學基礎之「蔬果農藥殘毒快速檢驗」技術，或稱「快速檢驗」，不僅成為本省農業推廣之基本科技，亦引起國際之重視，而成為對外新科技交流之重要項目，在此次研討會中將詳就研發過程，以及國際交流之成效等方面加以介紹。

「快速檢驗」之社會需求

歐美國家殘毒管制系統所採用之化學檢驗，並不適用於高溫多濕，病蟲害問題繁多，小農盛行之亞熱帶國家，其原因及解析已於民國81年「農藥安全研討會」之專文列述⁽¹⁰⁾。而新發展之「農藥殘毒快速檢驗」則因其高度之應用價值而廣受市場、農會，甚至衛生單位所採用。自民國74年西螺果菜市場首先設立第一處「蔬果農藥殘毒快速檢驗站」以來，迄今已增加至68站，遍佈全省及北高兩院轄市之各級農業、衛生單位，並獲消費者保護團體之認同^(5,6,7,9)。民國84年行政院研考會之專題評估報告對此技術亦予以肯定，除要求全面實施外，並要求主管殘毒檢驗之衛生單位應循此一新發展方向，進行研究改進及立法⁽²⁾。

「快速檢驗」與傳統檢驗之認知差異

主掌農藥殘毒檢驗之機構，傳統上均以化學檢驗為主體，強調精密正確為唯一認知條件，而罔顧其檢驗結果是否具有應用價值之時效性。「快速檢驗」極具時效性之特點，因彰顯了傳統化學檢驗僅有「驗屍」之功能，而常促使消費大眾及媒體等要求政府革新現行之技術及法令。因為「快速檢驗」之預警及把關兩項積極性功能受到肯定，難免地使主張傳統化學檢驗之人士感到困窘，或有情緒性之反彈，而引發兩學派之論戰。論戰對革新而言，有絕對的助益，因為論戰可以赤裸裸地暴露出，持不同論點之檢驗體系及人員，在學識及對社會需求認知上之差異。然而，新技術之發展本來就是針對舊技術之缺失而進行改進與更新，是一種挑戰與革新。因此「快速檢驗」新技術的發展，無疑是對現行之檢驗及行政管理體系，進行了一次徹底的能力體檢。實例之一即為，位居中央部會主掌殘毒檢驗之衛生署藥物食品檢驗局，在論戰的報告中暴露了它對有機硫磺類(Dithiocarbamates)殺菌劑與氨基甲酸鹽(Carbamates)殺蟲劑在毒理學上的作用，居然有分辨不清之嚴重問題^(8,11)，以及台灣省農業藥物毒物試驗所對 Ellman's test 不瞭解之問題⁽¹⁾。

「快速檢驗」之實施成效

自從實施「蔬果農藥殘毒快速檢驗」以來，台北農產運銷公司因為採用此一新技術，已成為全世界第一個能在市場拍賣前，成功地攔截含毒蔬果之範例，對殘毒之把關能力遠優於歐美等科技先進國，也是我國法定「農藥殘毒檢驗技術」所師承之國家，目前尚無法達成的目標。「快速檢驗」為國民健康把關的具體成效，自然使傳統的殘毒檢驗相形失色而受到社會大眾之注意。而此一由省農試所獨力開發出之「快速檢驗」技術，更引起了國際之重視，亞太糧食肥料技術中心為此技術而開辦國際訓練班^(14,15)，邀請亞洲地區七國學員參加，並獲菲律賓、泰國、馬來西亞及韓國等國家之重視而安排各項訓練，成為我國發展之技術優於歐美國家之成功實例。

「快速檢驗」之理論基礎

快速檢驗純係以毒理學及生理學為技術研發之藍本，並輔以化學分析方法，本質上屬綜合性之檢驗，不但以生物化學之探針補化學之不足，並以化學方法佐助生化分析技術，而兼具經濟及簡速之發展條件。其中，劇毒殺蟲劑之檢驗以乙醯膽鹼酯酶(Acetylcholinesterase, 簡稱AChE)進行分析，數類主要殺菌劑之殘留則以蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*, B.t.) 進行生物檢驗。

「快速檢驗」之內容及目標農藥

1. 以AChE 偵測有機磷劑及氨基甲酸鹽劑之殘留。
2. 硫代有機磷之不敏感性可經由萃取過程中，添加溴水轉化為正磷酸根後，再行檢測。
3. 凡 AChE 檢測呈陽性之樣品，均可進行薄層分析(TLC)檢出毒性物質之Rf值，再與資料庫中之Rf值比對，而鑑定其毒性來源。
4. 以蘇力菌檢測有機硫磺劑及雜環類等多類殺菌劑之殘留。

檢驗內容

殺蟲劑殘毒檢測

(A) AChE 檢測

1. 檢測目標：有機磷劑及氨基甲酸鹽劑。
2. AChE 來源：感性家蠅(*Musca domestica* L.) 經人工大量飼養後，收集其頭部大量製備 AChE，經冷凍乾燥後供試。
3. 蔬果樣品之萃取：切取表面積 18-24 平方公分之蔬果 (或重量相當於 1 公克植物組織)，加 1ml 甲醇混合振盪 3 分鐘後，傾出萃取液供試。此外，為提高 AChE 對 thiophosphates 類之感度，利用添加溴水之方法已經測試成功。其檢驗內容如(5)，但在樣品萃取時另加 0.1ml 的 1% 溴水共同振盪，傾出萃取液後供試，即可測得 organothiophosphates 之毒性(表一)。

表一、含硫代有機磷殘毒之蔬菜樣品添加溴水後，提高檢出能力之範例

Table 1. Enhancing the detection of organothiophosphates by reacting with bromine water

殺蟲劑	葉片含藥濃度 PPM	AChE 抑制率, %	
		(以 1ml 甲醇萃取)	(以 1ml 甲醇及 0.1ml 溴水萃取)
一品松	1.0	0	40.86
三落松	1.0	0	100
愛殺松	1.0	0	40.63
大利松	1.0	0	82.80
巴拉松	1.0	0	39.58

4. 檢測方法：以 Ellman (1959) 之 AChE 檢測方法為基準，於分光比色儀下進行 AChE 之 kinetic mode 測試 3-5 分鐘，檢測其反應速率。
5. 測試狀況：玻璃比色管內加 3ml 緩衝液 (0.1 M PBS buffer, pH=8.0)、20 μ l AChE 酵素稀釋液、20 μ l 樣品萃取液，反應 3 分鐘後加入 20 μ l 反應基質 (0.075M ATCI, Acetylthiocholine iodide) 及 100 μ l 呈色劑 [0.05M DTNB, 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)]，於 412nm 波長下讀取其呈色吸光度(absorbance) 增加速率。
6. 抑制率之計算公式：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{對照組吸光值} - \text{樣品組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100 \%$$

根據上述之檢驗步驟，可於十分鐘之內完成一件殺蟲劑殘毒之檢測。

(B) AChE 檢測之定性與定量

凡受檢蔬果樣品對 AChE 產生抑制作用時，即顯示有上述有機磷或氨基甲酸鹽兩大類劇毒農藥之殘毒存在。可將 10 μ l 樣品萃取液滴於 TLC 矽膠板上，於三種不同溶劑系統下展開層析，再以 AChE 生化反應之呈色技術標定樣品之 Rf 值。經與各種農藥已知之 Rf 值比對後，即可判定其毒性係來自何種農藥。最後，再依所判定之農藥與 AChE 抑制率之檢量關係估測殘留量，而依序完成「殺蟲劑快速檢驗」之(1)篩檢、(2)定性與(3)定量等一系列工作目標。

有機硫磺劑及其他雜環類殺菌劑之快速檢驗技術

依高⁽⁴⁾測試出殺菌劑對蘇力菌生長可產生抑制作用之理論基礎，而逐步研發成功殺菌劑快速檢測技術⁽¹²⁾，其主要工作內容概述如下。

1. 檢測目標：有機硫磺劑及其他類別殺菌劑。
2. 蘇力菌來源：由 CCRC 取得之 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*。
3. 蔬果樣品之萃取：切取表面積 18-24 平方公分之蔬果表皮 (或重量相當於 1 公克植物組織)，加 1ml EDTA 萃取液混合振盪 3 分鐘後，傾出萃取液供試。
4. 振盪培養及結果呈色：將樣品萃取液倒入含 1ml 蘇力菌培養液之三角瓶內，置入 37°C 恆溫振盪水槽內培養，90 分鐘後加入代謝指示劑 TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 繼續振盪 30 分鐘，最後再加入「反應中止」液，停止反應。
5. 檢測方法：樣品萃取液經步驟 (4) 之處理後，結果呈色極易分辨，因此可以用目測判定其呈色情形，必要時才需經離心，取上清液倒入比色管，以分光比色儀在 484nm 下進行吸光值測試，並比較與對照組吸光值之差異。
6. 抑制率之計算公式：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{對照組吸光值} - \text{樣品組吸光值}}{\text{對照組吸光值}} \times 100 \%$$

7. 蘇力菌受對 33 種蔬菜上常用七類殺菌劑之生長抑制情形見表二。
8. 含有有機酸之水果樣品，需以修正之技術進行檢驗⁽¹²⁾。
9. 含抗細菌生長物質之植物不適用此一技術⁽¹²⁾。

表二、不同類殺菌劑抑制蘇力菌生長能力之比較*

Table 2. Average B.t. growth inhibition by various fungicides in the cylinder and plate assay

殺菌劑類別	測試殺菌劑種類	蘇力菌生長受抑制之百分率, %
抗生素	2	73.5
有機銅劑	6	45.2
有機硫磺劑	7	90.6
有機錫劑	1	82.0
有機氮劑	10	38.6
有機氯劑	3	65.0
其他	4	40.0

* 採用Cylinder and plate 法

「快速檢驗」之國際合作推展現況

自1985年推出快速檢驗以來，國外已有多處試驗研究單位洽詢檢驗技術、應用性及試劑供應等相關資訊(表三)，此外曾應新加坡及泰國農業部之託，於民國80年及84年分別辦理研習(表四)。而在國際合作方面，農試所接受「亞太糧食肥料技術中心」之委託，辦理國際「農藥殘毒快速檢驗技術」研習會，首先於1993年訓練亞太地區七國18名學員，第二階段則由該中心將研習列為公元1995-2000年之五年巡迴講習重點工作，1995年已於菲律賓辦理，1996-1998年則將於馬來西亞、越南及泰國，分年繼續辦理技術研習，訓練各國之工作人員。

表三、1990-1995年函洽技術資料及要求提供檢驗試劑情形

Table 3. Requisitions for RBPR technical information and testing reagents

國別	姓名	洽詢時間
Argentina	Dr. C. A. Andrada	1994年10月
India	Dr. J. Thomas	1994年 6月
Guam	Dr. Mr. Mari Maruttani	1991年 3月
Korea	Mr. Soo-Gon Han	1993年 7月
Malaysia	Dr. T. M. Abdul	1993年 4月
	Mr. Cheah Uan Boh	1994年 3月
	Mr. Chai Lian Kuet	1994年 9月
	Mr. Tan Soo Hian	1995年 7月
Philippines	Dr. E. A. Verzola	1991年 5月
	Mrs. Paz B. Austria	1993年 6月
	Dr. A. W. Tejada	1993年 6月
	Dr. C. P. Padua	1994年 8月
	Dr. L. M. Varca	1995年 6月
	Ms. A. O. Marino	1995年 3月
Singapore	Dr. R. Ho	1990年 8月
	Ms. J. Lui	1993年 7月
South Africa	Mr. C. J. van der Berg	1990年 6月
Thailand	Mr. Kiattisak Jelatiranat	1993年12月
	Dr. B. Sikkamondhoj	1995年 3月
	Mr. M. G. Wright	1992年 8月
Western Somao	Mr. W. J. Cable	1993年 8月

表四、國外自行接洽農試所之訓練

Table 4. RBPR training for other countries

實施日期	學員國別	訓練地點
1. 1991年 1月20日至1月28日	新加坡農業部(2人)	台灣
2. 1995年 5月21日至5月27日	泰國農業部(18人)	台灣
3. 1996年：韓國(接洽中)	韓國(3人)	台灣

表五、亞太糧食肥料技術中心贊助之訓練

Table 5. RBPR training courses sponsored by the Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific region (FFTC)

實施日期	學員國別	訓練地點
1. 1993年 4月21日至5月2日	7國18人	台灣
2. 1995年 2月27日至3月4日	菲律賓(53人)	菲律賓
3. 1996(預定)	馬來西亞	馬來西亞
4. 1997(預定)	越南、韓國	越南、韓國
5. 1998(預定)	泰國	泰國

參考文獻

1. 中國時報。1987。「農藥殘留測試，汰菁存蕪」。中國時報 民國76年7月14日地方版 中興新村訊。
2. 行政院研考會。1995。「食品安全衛生及管理改善建議(草案)」討論會建議案。(84年7月27日於研考會召開)。
3. 梁同庭。1966。怎樣檢定蔬菜上的農藥殘毒。豐年 16:10-11。
4. 高靜華。1989。蘇力菌之增殖及其對小菜蛾之殺蟲力受殺菌劑之影響。國立中興大學昆蟲學研究所碩士論文 53pp。
5. 歐陽莉。1989。誰為消費者把關-農藥政策被毒死了嗎? 消費者報導 93: 34-37。
6. 綠生活雜誌。1994。反制農藥殘毒 p.176-182。
7. 蔡弘聰。1994。蔬果農藥殘留問題。衛生報導 4(11): 2-8。
8. 臺灣省農業試驗所。1987。七六農試應字第 7846 號函(76年12月3日)－覆農委會76農糧字第 6112638A號函(76年11月27)查詢衛生署藥檢局1987年調查報告質疑「生化法」適用性之公函。
9. 鄭允。1989。蔬菜農藥殘毒問題之解剖與建言。消費者報導 93: 38-41。
10. 鄭允、高靜華。1992。蔬果農藥殘毒之快速檢驗。農藥安全研討會論文集 pp. 231-241。中國農業化學學會，台北。
11. 藥物食品檢驗局。1987。利用生化檢驗法及氣相層析法進行蔬菜農藥殘留量之調查 18pp。行

政院衛生署藥檢局，台北市。

12. Chiu, C.S., C.H. Kao and E.Y. Cheng. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. *J. Agric. Res. China* 40:188-203.
13. Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
14. FFTC. 1994. Testing for pesticides in food. *FFTC Newsletter* 103:2-3.
15. FFTC. 1995. Training course on rapid bioassay. *FFTC Newsletter* 108: 6-8.

Research and Implementation of Rapid Bioassay for Pesticide Residues (RBPR) on Fruits and Vegetables

E.Y. Cheng, C.H. Kao, C.S. Chiu, T.M. Chou, Y.C. Lee and T.L. Tseng
Department of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Abstract

Chemical analysis for pesticide residues did not fit the diagnosing need in acute poisoning or monitoring the safety of fruit and vegetable in the fast-trading market. A toxicological method for the rapid screening and analyzing of pesticide residues has been developed by the combination of enzyme assay, microbial assay and TLC technique.

Residues of organophosphorus and carbamate insecticides were detected by Ellman's reaction with the acetylcholinesterase (AChE) and then determined by TLC for its identity, while the residue quantity was determined by the regression between pesticide concentration and % inhibition of AChE. Fungicide residue was assayed by *Bacillus thuringiensis* (B.t.) and then developed by TTC color reaction. One gram of plant sample was extracted with 1 ml methanol for insecticide test, or extracted with 2 ml of EDTA-DMSO solution for fungicide test. 20 ul of methanol extract was used for AChE assay, while 5-10 ul extract is enough for the qualitative TLC analysis. The thiophosphates were converted to their corresponding oxon-analogues by bromine water treatment in plant extract to increase the detectability by AChE.

Houseflies head AChE is more sensitive than the AChE from electric eel or honeybee. The 25% inhibition was considered as the threshold for detecting the residues of organophosphorus compounds and carbamats. Currently, the R_f values in three solvent systems of more than 30 organophosphorus and carbamate insecticides have been established for TLC identification.

The growth of B.t. is sensitive to the inhibition of ethylene bisdithiocarbamates (EBDC's) and other fungicides such as chlorothalonil, dinocap, captan and folpet. The sensitivities of B.t. test to

propineb, curzate-mancozeb, metalaxyl-mancozeb, mitram, mancozeb and maneb were above 0.7 ppm, and more than 12.5 ppm for zineb and Sankel. For chlorothalonil and dinocap, the sensitivity exceeded 2.5 ppm.

By combining the spectrophotometric AChE reaction, microbial assay of B.t. and TLC/biochemical AChE color development, two neurotoxic insecticide groups and the ETU-producing fungicides can rapidly be detected qualitatively and quantitatively. This pesticide residue diagnosis system can be used for both medical and agricultural purposes. More than 60 RBPR stations have been established in Taiwan, and the RBPR has also been adopted as the vegetable safety screening method for Taipei Public Health Bureau. Started from 1995, RBPR has been officially adopted in a 5-year's training program of the FFTC (Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region), and training workshops has been and will be held in other Asian countries i.e., Philippines (1995), Thailand (1995), Malaysia (1996), Vietnam (1997) and Korea (1997), respectively.

Key words: pesticide residues, rapid bioassay, insecticide, fungicide, acetylcholinesterase, *Bacillus thuringiensis*, thin layer chromatography, qualitative and quantitative analysis.