

食安把關新利器-農藥殘留免疫檢測技術

張淑貞¹、申屠萱^{1,*}、劉則言³、羅淑卿²、周桃美¹、高靜華¹

¹行政院農業委員會農業試驗所應用動物組; ²行政院農業委員會農業試驗所農業化學組;

³行政院農業委員會林業試驗所森林保護組; *通訊作者 e-mail: shentu@tari.gov.tw

摘要

針對食品安全，食藥署與農糧署每年都會以公告的食品中殘留農藥檢驗方法抽檢農產品上的農藥殘留。此方法雖很精準，但需應用逾千萬元的分析儀器，且樣品需逐件上機檢測，緩不濟急。農業試驗所為協助解決農產品的農藥快篩壓力，自1985年開始推廣以家蠅乙醯膽鹼酯酶與蘇力菌為核心的農藥快篩技術，可快速篩檢農產品上的有機磷、氨基甲酸鹽類等神經劇毒農藥與部份殺菌劑。但隨著農藥種類日漸增多，針對新作用機制之農藥尚無快篩方法，乃於2012年起針對常檢出之高風險農藥及未有公告檢驗方法之農藥種類，加速發展農藥免疫檢測快篩方法。農藥免疫檢測是新一代的農藥殘留檢測技術，其原理是基於抗體與抗原的特異性結合，此技術不受限於農藥類別，每種農藥都有機會可研發出其相對應的抗體。但因農藥分子小，不足以誘發動物產生抗體，需先將農藥連結至蛋白質上，再注射入動物體中，以誘發動物免疫反應產生農藥抗體。農藥抗體可應用於各項分析技術，進而衍生各項農藥檢測試劑與產品，使農藥檢驗更為快速、簡便，如應用直接競爭型ELISA，搭配免疫分析儀，一次檢測流程90分鐘，可同時檢測93個蔬果檢體含特定農藥的殘留量；搭配膠體金快篩片技術，10分鐘就能呈色，不需儀器，可直接以肉眼判讀；未來搭配漸臻成熟的微型晶片技術，可同時偵測同一檢體上的多種農藥。整體而言，農藥免疫檢測由於各項分析技術日益精進，將可更快及精準地檢測農藥殘留，進行農產品農藥即時把關，增進國人食的安全。

關鍵詞：農藥免疫檢測、農藥抗體、酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA)、膠體金。

前言

現今農藥的未依規定使用，已對食品安全造成嚴重威脅。為增進上市食品安全，衛生福利部食品藥物管理署（食藥署）與行政院農業委員會農糧署（農糧署），每年都會以公告的食品中殘留農藥檢驗方法抽檢農產品上的農藥殘留。如食藥署103年檢驗農產品2,528件，檢出不合格323件，不合格率12.8%（蔡等，2015）。目前國內已登記農藥362種，食藥署公告之「食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(五)」可檢測310項農藥（衛福部，2014），此公告檢驗方法雖然精準，但檢驗一件樣品需5,000~6,000元，樣品萃取流程冗長，需使用有毒的有機溶劑及多樣濃縮設備，再應用LC/MS/MS、GC/MS/MS及其相應之農藥資料庫比對分析，相關設備合計逾千萬元，且操作檢驗人員需具備相當之熟練度及專業、分析能力等。此外，樣品需逐件上機檢測，耗時費力，對於有時效性、不具長保存期的生鮮農產品來說，無法做到即時確認農產品食用安全或現場快速篩檢之需求，亦有抽驗件數限制。

農試所為建構農產品農藥殘留之快篩把關能力，在1963年即以活體家蠅於18個果菜市場進行安檢把關；於1985年再度推出以家蠅乙醯膽鹼酯酶及蘇力菌為核心的農藥殘留生化快篩方法，可快速篩檢農產品上殘留之有機磷、氨基甲酸鹽

類等神經劇毒農藥及部份殺菌劑，平均每件樣品檢驗需 10 分鐘。此生化法經多年推廣，至 2015 年止已輔導設置逾 380 處工作站，包括各地農會、合作社場、果菜批發市場、民間食品業者、超市連鎖業者、學童營養午餐、團膳及教育消保單位等，進行食安把關。以臺北農產運銷公司經營之果菜市場為例，每日平均抽驗 150~180 件，年平均抽驗 5 萬多件 (鄭等, 2015)。然而隨著農藥種類日漸增多，現有登記農藥已達 362 種，而現有農藥快篩方法除本所推廣之生化法外，尚無其他農藥快篩技術，因此本所針對常檢出不合格之高風險農藥與無公告檢驗方法之農藥種類，加速研發農藥免疫檢測快篩方法。農藥免疫檢測是新一代的農藥殘留檢測技術，此技術不受限於農藥類別，每種農藥都有機會研發出其相對應的抗體，具辨識專一性、可定量、高靈敏度及檢測方法簡便快速等優點，可以滿足農產品的農藥殘留快篩需求。

免疫檢測技術簡介

免疫檢測技術是基於抗體與抗原的特異性結合，以人為設計抗原並誘發動物產生免疫反應，取得對特定抗原具辨識力的抗體，並將抗體作為生物化學感測器，發展可對化合物、酵素或蛋白質等進行定性與定量分析的技術。免疫檢測隨著分析技術的日益進步，搭配其他分析方法，已發展出多種免疫分析檢測方法，例如放射免疫測定法 (Radioimmunoassay, RIA)、螢光免疫分析法 (Fluorescence immunoassay, FIA)、酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 等。其中酵素連結免疫吸附分析法係應用辣根過氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 或鹼性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase, AP) 等酵素來標記抗體或抗原，再加入受質，受質經上述酵素反應後的產物可經由光譜儀檢測判讀顏色深淺，藉此推測抗體或抗原量，可定性、定量兼具專一性及高敏感度，適合用於農產品的農藥殘留檢測。

農藥免疫檢測技術開發

免疫檢測技術因具專一、靈敏等特性，在人類醫學檢驗上的應用日趨重要，相關後續的檢驗材料、儀器也日益精進、簡便，其概念及分析技術也可以應用在農藥檢驗。開發農藥免疫檢測技術，首要之務即是農藥抗體的取得，但因農藥分子量較小的限制，製備抗體與後續分析方法也需有相對應的考慮與修改，茲將在農藥免疫檢測技術開發的問題及措施詳述如下。

一、農藥半抗原

農藥為小分子化合物，無法單獨誘發動物免疫反應產生抗體，但可被對應抗體辨識而產生專一性結合，為一種不完全抗原，又稱半抗原。農藥半抗原具備標的農藥之主要化學結構，以作為免疫系統辨識之特徵，並具備官能基，藉此官能基可連接於蛋白質載體，形成可誘發動物免疫反應的大分子免疫抗原。

二、農藥免疫抗原

能誘發動物產生抗體的抗原其分子量一般在 10 kDa 以上，通常為蛋白質。因此小分子農藥半抗原需與大分子蛋白質載體連結形成免疫抗原，才可以誘發動物免疫反應以產生抗體。常見的蛋白質載體包括牛血清蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA)、血藍蛋白 (Keyhole limpet hemocyanin, KLH) 等；其中牛血清蛋白因具穩定、不易變性、價格便宜易取得等優點，應用較廣泛。

三、農藥抗體製備

將農藥半抗原與蛋白質載體連結之免疫抗原注射入動物體內，經注射、免疫數次後，即可獲得對農藥具辨識力的抗體。抗體依產製過程可再細分為多株抗體及單株抗體，多株抗體直接來自免疫動物之血液，易於製備且生產成本較低。單株抗體製備則較為複雜，需先注射、免疫動物，篩選抗體產生良好的動物個體，再由此動物的脾臟分離出製造抗體的漿細胞，經細胞培養成群落後，再將此漿細胞與骨髓瘤細胞融合成融合瘤細胞，擴大培養、單株化，再篩選出會製造專一性抗體的融合瘤細胞株，重新注射入小鼠腹部，誘生腫瘤產生腹水，腹水中即含單株抗體。相較於多株抗體，單株抗體性質較單一、穩定，但製程複雜、耗時較久，生產成本較高。由上述兩種方法製備的農藥抗體，為確認其辨識農藥之專一性，尚須再進行農藥抗體對其他種類農藥的辨認測試，測試方法可採 ELISA 檢測。

四、農藥 ELISA 檢測

ELISA 是由 Engvall 和 Perlman 於 1971 年首次發表，因兼具專一性及敏感性，且操作容易、快速，故廣泛應用於各種檢驗。而因檢測目標性質不同，也衍生出許多 ELISA 類型，其中較適合農藥檢測者為直接競爭型 ELISA (Direct competitive ELISA, dc-ELISA) 與間接競爭型 ELISA (Indirect competitive ELISA, ic-ELISA)。

直接競爭型 ELISA 是將農藥抗體固定在微量盤，加入待測農藥與農藥半抗原-酵素結合體，兩者會互相競爭與此農藥抗體結合，其與抗體結合之複合物皆被留在微量盤。經清洗去除游離部份後，再加入受質呈色，經酵素免疫分析儀 (ELISA reader) 檢測顏色深淺以定量農藥。隨待測農藥濃度越高，農藥半抗原-酵素結合體競爭到的農藥抗體就越少，留在微量盤之複合物就越少，可催化受質的酵素活性越低，最終呈色就越淺。其中農藥半抗原-酵素結合體是指經標記酵素的農藥半抗原。

間接競爭型 ELISA 改將對照抗原固定在微量盤，再加入待測農藥與農藥抗體 (一級抗體)，對照抗原會與待測農藥互相競爭與此農藥抗體結合，經清洗去除游離部份後，微量盤內僅留下對照抗原與農藥抗體之結合複合物。再加入經酵素標記的二級抗體，因其可辨識一級抗體而與之結合，故清洗去除游離部份後，僅餘對照抗原、農藥抗體、二級抗體的結合物留在微量盤，再加入受質呈色，經酵素免疫分析儀檢測顏色深淺藉以定量農藥，待測農藥濃度越高，最終呈色就越淺。其中對照抗原是指將農藥半抗原連結於非免疫抗原載體之蛋白質所製成的抗原。

兩者相較而言，間接競爭型 ELISA 步驟較為複雜，但也因一級抗體、二級抗體等多重結合，可使訊號放大、靈敏度較高，多用於實驗室內的學術研究。直接競爭型 ELISA 則因步驟較少，可簡化操作流程，所以較適用於具時效性樣品大量快篩。

進行農藥 ELISA 檢測時，通常其呈色酵素活性的被抑制率達 10% 時的農藥濃度，稱之為此農藥 ELISA 檢測之偵測極限。Watanabe 和 Miyake (2013) 曾彙整賽速安 (Thiamethoxam) 農藥 ELISA 檢測之多篇相關研究，其中賽速安 ELISA 檢測之最低偵測極限為 0.05 ppb，HPLC/MS/MS 分析最低的偵測極限為 0.14 ppb，顯示賽速安 ELISA 的偵測極限優於 HPLC/MS/MS 分析。Watanabe 和 Miyake (2013) 繼之在小黃瓜及蕃茄上外加賽速安後，再分別以 HPLC 與 ELISA 檢測賽速安，比較兩者分析之結果。其中以 HPLC 分析之

樣品需經數種有機溶劑與 SPE 萃取後再濃縮，以 ELISA 分析之樣品則僅以甲醇萃取後再稀釋，最後結果顯示兩種方法的農藥回收率及準確度都相當。

五、檢體前處理技術及農藥回收率

依據食藥署公告之食品中殘留農藥檢驗方法，農產品中農藥萃取之前處理需經過數種有機溶劑萃取、淨化、乾燥、回溶及過濾等步驟，才能注入 LC/MS/MS 與 GC/MS/MS 等精密儀器進行分析（衛福部，2014）；樣品前處理時間長、過程繁雜，且需使用劇毒有機溶劑。相較之下，ELISA 方法檢體萃取流程簡單許多且不需使用劇毒有機溶劑。Watanabe 等人 (2005) 於蘋果、桃子汁中外加農藥克凡派 (Chlorfenapyr)，使用甲醇以手搖晃 3 分鐘萃取，萃取液經濾膜過濾並以緩衝液稀釋 25 倍後即進行克凡派 ELISA 檢測，所得農藥回收率為 88.0-100.0%。Watanabe 等人 (2007) 亦於蘋果、葡萄、柑橘等果汁外加農藥益達胺 (Imidacloprid) 後，進行益達胺 ELISA 檢測，其回收率為 82.0-128.7%；另將小黃瓜及番茄打汁後外加賽速安後以賽速安 ELISA 檢測，其回收率為 88.4-110.2%。Qian 等人 (2009) 於甘藍及葡萄外加農藥陶斯松 (Chlorpyrifos)，以陶斯松 ELISA 檢測，其回收率在 82.4~94.6% 間。以上試驗結果皆顯示農藥 ELISA 檢測方法簡便，且正確率高。

本所自 2011 年起即以免疫檢測技術為基礎，研發並建立數種農藥之免疫檢測技術，並逐一針對多項作物進行 ELISA 農藥回收率測試。以農藥待克利 (Difenoconazole) 為例，目前已開發的待克利 ELISA 檢測技術之偵測極限為 0.01 ppb，其靈敏度優於我國農產品公告儀器檢出限界即最低安全容許量 0.01ppm 之 1000 倍。並進一步於敏豆、甜豆、青椒、草莓等農產品表皮外加待克利商品農藥並經風乾，再採用本所研發推廣之生化法農藥檢測的樣品前處理方法，以酒精震盪萃取 (Chiu *et al.*, 1991)，另外再經緩衝液稀釋 50 倍後以待克利 ELISA 檢測，並經由標準曲線計算其待克利濃度，可得其待克利回收率為 77.8-128.1% (張等未發表資料，2016)。

總合上述數種農藥 ELISA 檢測方法，顯示 ELISA 檢體所需之前處理技術簡便，不需使用劇毒有機溶劑，且檢體外加農藥之農藥回收率皆在管制範圍 60-140% 間 (徐等，2014)，正確率與目前食藥署公告之檢驗方法相當。

農藥快篩商品

一、農藥 ELISA 試劑套組

國內目前尚無農藥 ELISA 商品，但在動物用藥方面則已有氯黴素、四環黴素、萊克多巴胺、瘦肉精...等多種抗生素及藥物之 ELISA 試劑套組 (臺灣尖端先進生技醫藥股份有限公司網站)。在植物病毒檢測方面則已有蕙蘭嵌紋病毒 (Cymbidium Mosaic Virus, CymMV)、胡瓜嵌紋病毒 (Cucumber Mosaic Virus, CMV) ...等多種病毒檢測之 ELISA 試劑套組 (睿嘉生物科技股份有限公司網站)。農藥 ELISA 試劑套組目前在國內尚無相關產品上市，國外在日本、美國及加拿大則皆已有相關商品。日本 HORIBA 公司推出之 Smart Assay 系列，共有 21 種農藥 ELISA 試劑套組 (HORIBA 公司網站)，係採用直接競爭型 ELISA。

本所針對食藥署與農糧署近年來常檢出違規使用之高風險農藥，選取亞滅培 (Acetamiprid)、芬普尼 (Fipronil)、待克利 (Difenoconazole)、達滅芬 (Dimethomorph) 等多種農藥研發農藥免疫檢測技術，並已於 2015 年 12 月

公告技轉。此技術可依照農藥生化檢驗站及產銷單位需求，進一步整合成同類作物之多合一農藥 ELISA 檢測套組，一次可驗該作物類別常用之 8~12 種農藥，以期增加農藥快篩種類。以芬普尼為例，芬普尼為食藥署於 2014 年抽驗農產品殘留農藥檢出不合格率排名第一，抽驗 2,528 件樣品中即有 55 件驗出芬普尼(蔡等, 2015)，若使用農藥 ELISA 增加快篩件數，當可攔阻更多違規使用農藥之農產品。除現有已開發 8 類農藥之抗體外，仍持續針對其他常檢出殘留農藥種類研發其免疫檢測技術，以期擴增應用範圍。

二、農藥免疫快篩片

國內外目前尚無農藥免疫快篩片商品，但在動物用藥方面，國內針對漁畜產品之抗生素及瘦肉精等已有免疫快篩片商品(臺灣尖端先進生技醫藥股份有限公司網站)。免疫快篩片係根據已建立之免疫檢測技術，結合膠體金與免疫層析方法所衍生之檢測試劑型式。免疫快篩片應用膠體金標記抗體，以條狀纖維層析材料為固相，通過毛細作用讓樣品在層析條上流動，而使樣品中的農藥、層析條上的對照抗原，共同競爭與經膠體金標記的抗體結合。故樣品中無農藥時，會出現膠體金的紅色條帶，若樣品中有農藥則無色。免疫快篩片經檢體簡單前處理後即可使用，反應時間僅需 5~10 分鐘，不需搭配儀器，可直接以肉眼判讀，適合農民與消費者自主檢測。此技術研發門檻較高，本所目前已建立亞滅培免疫快篩片，最低偵測極限為 0.5 ppm，若能配合濃縮檢體，尚可再增加檢測靈敏度(張等未發表資料, 2016)。在中國大陸王等人(2015)則已建立農藥陶斯松(Chlorpyrifos)免疫快篩片，最低偵測極限為 4 ppm。

三、農藥晶片

目前國內外相關晶片分析技術尚未成熟，故皆無農藥晶片商品。Yang 等人(2008)應用微機電技術整合多個微元件共同置於微流體晶片中，利用螢光偵測儀檢測微晶片上的免疫反應，可檢測檢體中的腸病毒(enterovirus)。由於免疫晶片分析技術皆以偵測抗原與抗體間特異性結合之結合物為基礎，本所已研發之農藥免疫抗體未來亦可搭配漸臻成熟的微型晶片技術，整合多種農藥抗體在單一晶片上，將可同時偵測單件農產品上之多種農藥，以提供更精準有效之高風險農藥快篩把關。

結論

農藥免疫檢測是應用抗體與抗原特異性結合的原理，所發展之新一代農藥殘留快篩技術，搭配日益精進的分析技術，可快速精準的擴大農產品農藥殘留把關範圍。農藥免疫檢測技術應用直接競爭型 ELISA，搭配免疫分析儀，一次檢測流程 90 分鐘，可同時檢測 93 個檢體，亦能針對高風險作物群整合多種農藥同時進行快篩。搭配膠體金所研製之快篩片，10 分鐘就能呈色，不需儀器即可判讀；搭配晶片技術，可同時偵測同一檢體上的多種農藥。上述方法僅農藥直接競爭型 ELISA 在國外已有商品，但價格昂貴，無法普及利用。本所發展農藥免疫檢測技術，擬分階段開發 ELISA 試劑組、膠體金快篩片及晶片技術，以及整合型之農藥檢驗試劑套組，可適用於生產端、超市賣場及消費端等階層，將可強化目前本所已推廣之生化把關檢驗體系，擴大農藥快篩效能，落實食品安全把關。

引用文獻

衛生福利部。2014。食品中殘留農藥檢驗方法-多重殘留分析方法(五)。103.07.03 部授食字第 1031900615 號公告修正。

- 王菡、李高華、張陽、陳濤、薛小平。2015。膠體金側向流免疫層析技術檢測有機磷農藥殘留。食品安全質量檢測學報 6: 4409-4415。
- 徐雅慧、陳儀驊、林美智、劉宜祝、陳惠芳、施養志。2014。中藥之農藥殘留檢驗(X)。食品藥物研究年報 5: 211-223。
- 鄭允、黃毓斌、江明耀、侯怡亘、粘君綺。2015。生化及化學法聯檢之農藥殘留管理研究：北市模式。臺灣農業研究 64: 53-63。
- 蔡宜芳、蘇秀琴、余婉慈、劉芳銘、林宜蓉、王慈穗、楊淑鳳、江怡君、傅瓊慧、施義雄、黃文正、陳佩妤、黃月鳳、李明鑫。2015。103 年度市售農產品殘留農藥監測。食品藥物研究年報 6: 86-108。
- Chiu, C. S., C. H. Kao, and E. Y. Cheng. 1991. Rapid bioassay of pesticide residues (RBPR) on fruits and vegetables. *Jour Agric Res China* 40: 188-203.
- Engvall, E., and p. Perlmann. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.
- Qian G., L. Wang, Y. Wu, Q. Zhang, Q. Sun, Y. Liu and F. Liu. 2009. A monoclonal antibody-based sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of the organophorous pesticides chlorpyrifos-methyl in real sample. *Food Chem.* 117: 364-370.
- Watanabe E., H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo and M. Urji. 2004. *J. Agric.Food Chem.* 52: 2756-2762.
- Watanabe E., K. Baba, H. Eun, T. Arao, Y. Ishii, M. Urji and S. Endo. 2005. Evaluation of a commercial immunoassay for the detection of chlorfenapyr in agricultural samples by comparison with gas chromatography and mass spectrometric detection. *J. Chromatography A.* 1074: 145-153.
- Watanabe E., K. Baba, H. Eun and S. Miyake. 2007. Application of a commercial immunoassay to the direct determination of insecticide imidacloprid in fruit juices. 2007. *Food Chem.* 102: 745-750.
- Watanabe E., and S. Miyake. 2013. Quantitative determination of neonicotinoid insecticide thiamethoxam in agricultural samples: a comparative verification between High-Performance Liquid Chromatography and monoclonal antibody-based immunoassay. *Food Anal. Methods.* 6: 658-666.
- Yang, S. Y., K. Y. Lien, K. J. Huang, H. Y. Lei, and G. B. Lee. 2008. Micro flow cytometry utilizing a magnetic bead-based immunoassay for rapid virus detection. *Biosens. Bioelectron.* 24: 855-862.