

農藥免疫檢測技術開發 與應用

農業藥物毒物試驗所 謝玉貞·蔣慕琰

一. 前言

農藥由於具有高效率、快速、方便、廣效性、經濟效益顯著等特點而被廣泛應用於農產品生產。目前全世界使用的農藥種類超過700多種，包括殺蟲劑、除草劑、殺菌劑、生長調節劑等，長期大量地使用農藥，在得到效益的同時，也產生廣泛的副作用，農藥的過度使用和不合理使用，對生態環境造成嚴重的污染與危害。進入21世紀後，人們對食品安全、環境保護問題越來越重視。

對於目前常見於農藥檢驗方法有生化檢驗法、儀器分析法及免疫分析法。其中免疫分析法是一種以抗體做微生物化學檢測器對化合物、酶或蛋白質等物質進行定性和定量分析的技術，能用於農藥快速檢測，主要有螢光免疫測定技術、放射免疫測定技術及酵素連結免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等方法，因ELISA具有高專一性、快速、靈敏、檢驗成本低及可同時進行大量樣本檢測等優點，因此具有廣泛的

實際應用之價值。台灣農藥檢測目前以儀器分析法為主，其次為生化檢驗，免疫檢測法僅有少數個案利用。本文主要簡介ELISA方法，探討在台灣利用的可行性。

二. 酵素連結免疫吸附分析法 (ELISA) 的原理

酵素連結免疫吸附分析法以抗原及抗體間特異性鍵結為原理，用以檢測及初步定量特定之抗原或抗體。ELISA的敏感性與抗原抗體間親和力有關。抗原或抗體的固相化及抗原或抗體的酶標記，根據酶反應底物顯色的深淺進行定性或定量分析。由於酶的催化效率很高，間接地放大了免疫分析的結果，使測定具有極高的靈敏度，在應用中一般採用商品化的試劑盒進行測定，其特點是將抗原或抗體製成固相試劑，在與標本中抗原或抗體反應後，只需經過固相的洗滌，就可以達到抗原抗體複合物與其他物質的分離，簡化了操作步驟。酵素連結免疫吸附分析法的樣品前處理簡單，純化步驟少，大樣本分析時間

短，既適合於實驗室檢測，又可用於現場篩選，具有分析速度快、經濟、簡便的特點，但抗體製備不易，而且不能完成多種農藥同時檢測，限制了該技術的應用。

三. 農藥檢測免疫抗體之製作

1. 半抗原的設計與合成

大多數農藥是為小分子物質，其分子量小於1,000。而分子量小於1000的小分子，在免疫學上稱為半抗原—此類分子通常具抗原性，然而不具有免疫原性，即使注射到動物體內，亦無法刺激或誘導動物產生抗體。故需以一能提供T細胞辨識之大分子攜帶蛋白作為載體，如牛血清白蛋白、人血清白蛋白、甲狀腺球蛋白、卵清蛋白，與半抗原連結再注射到動物體內才足以在動物體內引起免疫反應。

2. 抗原與載體鍵結

利用半抗原及載體上之特定官能基(-NH₂、-COOH、-OH、-SH和-CO-)進行鍵結

3. 螯合

依使用農藥不同目前常用的螯合方法可分為戊二醛 (glutaraldehyde) 法、NaNO₂法、混合酸酐 (mix anhydride) 法及 carbodiimide 法。

4. 抗體製作

抗原結合比的高低與反應比例、反應特定官能基的活性和位置有關，半抗原結合比過高或過低均影響抗體的生成，一般

以5~15為宜，但也有試驗結果表明，半抗原結合比的大小對誘導抗體產生並無決定性影響，每分子蛋白質只連接一個半抗原也可以產生特異性抗體，並且低結合比還有助於提高抗體的選擇性和親和性。另外，製作好的半抗原結合物在應用於免疫動物前，以分光測光儀偵測或者以SDS-PAGE蛋白質電泳分離技術方式偵測半抗原是否有接上載體，因為結合中半抗原分子數目太多或太少，誘發抗體的能力都很差。抗農藥抗體可用農藥-載體蛋白結合物直接免疫紐西蘭大白兔等動物，之後每間隔一個月加強免疫一次，一般6個月左右可以獲得高效價的抗血清。

四. ELISA在農藥檢測之研發應用

1. 除草劑檢測之應用

20世紀90年代以來，國外對除草劑殘留的免疫分析研究取得了很多成果，有的產品較早地應用於市場。利用製備的2,4-D多株抗體或單株抗體檢測水、食品和土壤中2,4-D的殘留。Schlaeppli等利用單株抗體直接法檢測莫多草 (metolachlor)。Rubio (2005) 利用嘉磷塞 ELISA 對土壤和水中嘉磷塞 (glyphosate) 除草劑進行檢測。蔣永正等 (1999, 2003) 利用草殺淨 (ametryn) 及巴拉刈 (paraquat) 免疫檢驗試劑商業套組檢測胡瓜及玉米的農藥殘留。

2. 殺蟲劑檢測之應用

有機氯殺蟲劑該類殺蟲劑使用時間最

長，應用範圍最廣，但對其殘留免疫分析研究卻較少。Centeno和Johnson(1970)以馬拉松(malathion)和DDT為半抗原，製備的抗體僅對DDT有較低的效價。有機磷殺蟲劑是目前世界上使用量最大的一類殺蟲劑。1981年，Ercegovich等首先用巴拉松(parathion)放射免疫分析法(RIA)檢測人的血液和植物葉片上的有機磷殘留量。McAdem和Hill(1992)製備的殺螟松(fentrothion)單株抗體檢測穀物中的殘留量。Lehotay和Argauer(1993)利用Millipore公司生產的得滅克代謝產物(aldicarb sulfone)和加保扶(carbofuran)檢測試劑套組檢測肉、肝臟、牛奶、血液和尿中的農藥殘留量。Shan等(1999)利用自製的特異性、靈敏度均較好的除蟲菊精類益化利(esfenvalerate)抗體進行ELISA分析，且與其他擬除蟲菊精類農藥幾乎無交叉反應。Stanker等(1989)利用自製的合成百滅寧(permethrin)單株抗體檢測肉類中的合成百滅寧，檢出率為62%。

3. 殺菌劑檢測之應用

有關殺菌劑的免疫分析的研究較少，可能與其毒性相對較低，品種輪換較快有關。Marco等(1993)利用滅達樂(metalaxyl)ELISA方法檢測以水溶液提取的馬鈴薯和蘋果樣品。Qeffelec(2001)利用ELISA法檢測了葉類蔬菜的得恩地(thiram)含量。Itak等(1993)用製備的免賴得(benomyl)與貝芬替(carbendazim)抗體檢測了水、果汁和土壤中的免賴得及貝芬替的含量。

五. ELISA在農藥檢測中存在的問題

ELISA檢測系統中的抗農藥抗體對於結構非相關的半抗原(農藥)表現極高特異性，但某些與檢測農藥結構密切相關的農藥，或待檢農藥的代謝產物可能與抗待檢農藥抗體發生不同程度的交叉反應。如果樣品中存在這些物質，將導致定量檢測準確度降低，使該農藥的定量檢測降為半定量或定性檢測或者出現定性假陽性與假陰性，因此影響ELISA在農藥殘留檢測中的可靠性與靈敏度。由於農藥免疫檢驗試劑商業套組操作型式不同，故不能同時進行多種農藥檢測，這在一定程度上限制了ELISA在農藥殘留檢測上的應用。

六. 結語

儀器分析法能夠有效區分農藥殘留的種類及其殘留量，為目前最常用的技術。然而此法需要昂貴之儀器及對操作人員要求高，才能勝任，檢測過程繁雜，需要時間較長，不易進行大量檢驗，故無法普遍實施。而ELISA則不受設備及需專業人才之限制，其優點因具高專一性、快速、靈敏、檢驗成本低及可同時進行大量樣本檢測，操作簡單，可做為在檢測單一農藥初步大量篩選樣本時，快速且良好選擇檢測方法，雖侷限在單一農藥，但不受限於生化檢驗法缺點之影響，廣泛應用於各種農藥之快速免疫檢驗。總之，目前ELISA應用於農藥免疫檢測尚存一些限制，也不可能替代儀器分析法。但ELISA分析技術

自身優勢和在方法上的不斷完善，尤其是隨著親和力增加、特異性高的標準化抗體

生產技術的突破和免疫偵測器技術日臻完善，將是未來具潛力的分析檢測技術。

附表 1995年後所發展農藥免疫檢測技術

Class	Name, matrix	檢測物	Class	Name, matrix	檢測物
Herbicide (除草劑)	Chlorpropham, food (抑芽劑克普芬)	食品	Insecticide (殺蟲劑)	Organophosphates (有機磷劑)	
	Isoproturon, water (異丙隆)	水		Fenitrothion, food, water (撲滅松)	食品、水
	Metsulfuron-methyl, water (甲磺隆)	水		DDT, soil, food (殺蟲劑二氯雙苯三氯乙烷)	土壤、食品
	Bensulfuron-methyl, water (免速隆)	水		Etofenprox (依芬寧)	
	Chlorsulfuron (氯磺隆)			Phosalone (裕必松)	
	Fluometuron, soil (氟草隆)	土壤		Spinosyn A, water (賜諾殺)	水
	Trifluralin, soil, water, food (三福林)	土壤、水、食品		Spinosad, food, water, sediment (賜諾殺)	食品、水、沈積物
	Cyclohexanedione (環己烯氧環殺草)			Imidacloprid, water, food (益達胺)	水、食品
	Triazines, water, food (如草脫淨、草滅淨等類)	水、食品		Acetamiprid, water, food (亞滅培)	水、食品
	Dichlobenil (敵草)			Azadirachtin, food, formulations (印棟素)	食品
	Propanil, water (敵稗)	水		Oxamyl, food (歐殺滅)	食品
	Dichlorprop methyl ester			Propoxur (安丹)	
	Hexainone, water	水		Malathion (馬拉松)	
	fluroxypyr, triclopyr, soil (氟氯比、三氯比)			Parathion(巴拉松)	植物、血液
	2,4-D soil, water, food	土壤、水、食品		Fentrothion(殺螟松)	穀物
Glyphosate, soil, water (嘉磷塞)	土壤、水	Myclobutanil, soil, water, food (邁克尼)	土壤、水、食品		
Paraquat (巴拉刈)	植物	Procymidone, food (撲滅寧)	食品		
Ametryn (草殺淨)	植物	Benalaxyl, food, water (本達樂)	土壤、水		
Insect growth regulator (昆蟲生長調節劑)	Fenoxycarb (芬諾克)		Thiram, food (得恩地)	食品	
	Flufenoxuron, soil, water (氟芬隆)	土壤、水	Chlorothalonil, water, plant residues, food (四氯異苯腓)	水、植物殘留、食品	
Insecticide (殺蟲劑)	Hexachlorocyclohexane, water, soil (蠹必死)	土壤、水	Tebuconazole, food (得克利)	食品	
	Azinphos-methyl, water (谷速松)	水	Thiabendazole, food (腐絕)	食品	
	Carbofuran, food (加保扶)	食品	Imazalil, food (依滅列)	食品	
	Chlorpyrifos, water (陶斯松)	水	Tetraconazole (四克利)		
	Chlorpyrifos-ethyl (乙基陶斯松)		Myclobutanil, water, soil, food (邁克尼)	水、土壤、食品	
	Pymetrozine, plants (派滅淨)	植物	Hexaconazole, formulations (菲克利)		
	Azinphos-methyl, water (谷速松)	水	Didecyldimethylammonium chloride (氯化二癸二甲基銨)		
	Pyrethroids (除蟲菊精類)		Methyl 2-benzimidazolecarbamate, soil, food (貝芬替)	土壤、食品、水	
	Allethrin (亞烈寧)		Captan, food, water (蓋普丹)	食品、水	
	Esfenvalerate, water (益化利)	水	Metalaxyl(滅達樂)	食品、水	
	Flucythrinate, soil, water, food (護賽寧)	土壤、水、食品	Benomyl(免賴得)	土壤、食品、水	
	Permethrin, air, water (百滅寧)	空氣、水			