

應用直接競爭型酵素免疫分析法檢測農產品中 芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之殘留

張淑貞^{1,*} 申屠萱² 高靜華³ 羅淑卿⁴ 江明耀⁵

摘要

張淑貞、申屠萱、高靜華、羅淑卿、江明耀。2022。應用直接競爭型酵素免疫分析法檢測農產品中芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之殘留。台灣農業研究 71(2):159–170。

為評估農藥免疫檢測快篩法之農藥把關效能，應用直接競爭型酵素免疫分析 (direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay; dcELISA) 商品檢測農產品中之芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利殘留。此 4 種農藥的 dcELISA 可檢測範圍與檢測極限分別為 0.5–100 ng mL⁻¹ 與 0.23–0.52 ng mL⁻¹。小松菜、胡蘿蔔、綠茶、南瓜、山藥切碎後各外加芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利 50 ng mL⁻¹，經萃取、稀釋後以 dcELISA 檢測農藥，此 4 種農藥之回收率各為 73.1–123.6%、61.7–111.1%、72.5–102.3%、67.9–113.9%。顯示農藥免疫檢測之靈敏度高，農藥回收率良好，由檢體萃取至結果判讀僅需 1 h，未來可應用在農產品高風險農藥之快篩檢測。

關鍵詞：直接競爭型 ELISA 免疫檢測、芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利。

前言

針對食品安全，台灣的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—多重殘留分析法』抽檢市售農產品上的農藥殘留。『食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法 (五)』於 2019 年 5 月 10 日公告修正，可檢驗 380 品項農藥 (<https://www.fda.gov.tw/TC/>)，檢體採用 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 方法進行前處理，再以氣相層析串聯質譜儀 (gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC/MS/MS) 或液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS) 分析農藥。此方法之檢體處理方法複雜且須使用毒性化學物質，分析

儀器昂貴、耗材成本高，且需單件逐一上機分析，耗費時間長，並需由專業人才操作，不易廣設檢驗站，亦無法滿足市售農產品臨場快篩把關的需求。

台灣自 1985 年開始推廣以家蠅乙醯膽鹼酯酶及蘇力菌為核心的農藥快篩方法，快速篩檢農產品上殘留之有機磷、胺基甲酸鹽類等神經劇毒農藥及部分殺菌劑 (Chiu *et al.* 1991; Cheng *et al.* 2015; Chang *et al.* 2016)，經多年推廣此項技術已廣泛應用於民間單位進行農藥殘留自主把關檢驗，每年抽驗件數逾 100 萬件。因應劇毒農藥逐年禁用政策，台灣在 2014 年開始應用抗原、抗體特異性結合的免疫學原理，針對市面上常檢出不合格之高風險農藥，發展農藥免疫檢測快篩技術，隨後在 2016 年後開始有相關之農藥免疫檢測快篩

投稿日期：2021 年 10 月 17 日；接受日期：2022 年 2 月 25 日。

* 通訊作者：scchang@tari.gov.tw

¹ 農委會農業試驗所應用動物組副研究員。台灣 台中市。

² 農委會農業試驗所應用動物組技佐。台灣 台中市。貢獻度等同第一作者。

³ 農委會農業試驗所應用動物組前研究員兼組長。台灣 台中市。

⁴ 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。

⁵ 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

商品上市 (Chang *et al.* 2018)。農藥免疫檢測技術係應用免疫學原理，研發可辨識特定農藥的抗體，再結合膠體金側流免疫分析技術 (colloidal-gold based lateral-flow immunoassay) 或酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 技術，製成檢測試劑，可用於快篩農產品中的農藥殘留。其中直接競爭型酵素免疫分析 (direct competitive ELISA; dcELISA) 較適合用來發展為農藥檢測之商品，因其已將農藥抗體固定在微量盤，實際操作時，只要加入待測農藥與酵素-農藥半抗原結合體，二者同時競爭與農藥抗體結合的機會，經洗滌去除游離部分後，與農藥抗體結合之酵素-農藥半抗原會被固定在盤底，再加入受質呈色並經光譜儀偵測，即可經由顏色深淺，來推得待測樣品中之農藥含量，日本、美國已有相關產品 (Watanabe *et al.* 2004, 2005; Kranthi *et al.* 2009; Yamasaki *et al.* 2015)。台灣現也有 4 合 1 農藥 ELISA 試劑套組，應用 dcELISA，在同一 ELISA 96 孔盤中同時檢測芬普尼 (fipronil)、亞滅培 (acetamiprid)、達滅芬 (dimethomorph)、得克利 (tebuconazole) 等 4 種農藥，依其說明書言檢測極限各為 0.68、1.14、0.23、0.61 ppb，皆較『食品中殘留農藥檢驗方法—多重殘留分析方法(五)』中，上述 4 種農藥之檢測極限 1–50 ppb 低，應可嘗試應用在農產品農藥殘留檢測。其中芬普尼、亞滅培為殺蟲劑，達滅芬、得克利為殺菌劑。芬普尼為苯吡唑類 (phenylpyrazoles) 殺蟲劑，對昆蟲兼具接觸毒與胃毒，對非目標昆蟲如蜜蜂毒性高且會降低雄蜂生育力 (Mayer & Lunden 1999; Yu 2008; Kairo *et al.* 2017)。台灣已於 2017 年公告禁用 4.95% 芬普尼水懸劑，但依據農糧署於 2019 年 1 月至 2020 年 6 月農作物農藥殘留檢測的月報表，每月皆有農產品被驗出芬普尼不當殘留 (<https://www.afa.gov.tw/cht/>)，顯示芬普尼仍有違規使用情形。亞滅培為新尼古丁類系統性殺蟲劑，具高水溶性，其作用機制是與尼古丁乙醯膽鹼受體 (nicotinic acetylcholine receptor) 結合，干擾乙醯膽鹼神經訊息之傳遞，造成昆蟲過度興奮並癱瘓而死亡 (Tomizawa & Casida 2005; Yu 2008)，在台灣可用於茶、十字花科包葉菜類、小葉菜類等

多種作物上之薊馬、粉蟲、蚜蟲、黃條葉蚤等重要害蟲防治。達滅芬為肉桂醯胺類 (cinnamic acid amides) 殺真菌劑，具局部系統移行性，可抑制疫病 (phytophthora diseases)、露菌病 (downy mildew) 等病原真菌之菌絲及游走孢子生長 (Cohen *et al.* 1995; Reuveni 1997; Ann *et al.* 2015)，在台灣常用於防治多種根莖類、果菜類及葉菜類作物之疫病與露菌病。得克利為三唑類 (triazoles) 殺真菌劑，具系統移行性，兼具保護及治療性效果 (Brenneman & Culbreath 1994; Rial-Otero *et al.* 2005; Paul *et al.* 2007)，用於防治多種作物之炭疽病 (anthracnose) 與瓜果類白粉病 (powdery mildew) (Wong & Midland 2007; Xu *et al.* 2014; Keinath 2015)。此 4 種農藥除芬普尼目前禁用外，其餘皆為台灣農作物上普遍使用的農藥。食藥署於 2010–2017 年間抽驗市售農產品農藥殘留，達滅芬檢出違規率則每年皆在前 3 名，芬普尼、亞滅培、得克利則輪流名列前 4 名，顯示此 4 種農藥在台灣違規使用風險較其他農藥高，宜加強殘留檢測 (Hou *et al.* 2019)。

為評估農藥免疫檢測快篩法在現有農藥生化快篩系統中，強化農藥把關效能之可行性，故擬評估農藥免疫檢測快篩法與農藥生化快篩法檢體萃取液共用之可行性。因農藥生化快篩法中，農產品中的農藥以乙醇萃取，萃取液中植體切碎後釋出之干擾物質與乙醇是否會降低農藥抗體之檢測極限，影響農藥抗體之農藥辨識能力，皆有待進一步地確認，故進行本研究。

材料與方法

藥劑與儀器

試驗中使用的 49 類共 93 種農藥詳如附錄，有些農藥因為已在台灣農業禁用，故改購入高純度之標準品，如芬普尼標準品 (96% 純度) 購自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)，商品農藥亞滅培 (20% soluble powder; SP)、達滅芬 (50% wettable powder; WP) 購自興農股份有限公司 (台灣台中市)，得克利 (25.9% emulsifiable concentrate; EC) 購自台灣拜耳股份有限公司 (台灣台北市)。其中芬普尼標準品因在水中的溶解度僅 2 mg L^{-1} ，故以甲醇先

配製成 2 mg mL^{-1} stock solution，其餘 3 種商品農藥則以 $100 \text{ mM phosphate buffered saline (PBS) buffer}$ 配製成 2 mg mL^{-1} stock solution，存放於 4°C ，試驗前再稀釋至所需濃度。芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組購自費司科技有限公司 (台灣台中市)。ELISA 以 96 孔微量盤酵素免疫分析儀 (ELx808™ Absorbance Microplate Reader) (Biotek, Winooski, VT, USA) 及微量盤清洗儀 (Wellwash™ Microplate Washer) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 進行。

dcELISA 之檢測極限

參考芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組使用說明，為能應用標準檢量線估算檢體中的農藥濃度，故以內含 1.9% 乙醇的樣品萃取稀釋液配製上述 4 種農藥，濃度各為 0、0.5、1、3、10 及 100 ng mL^{-1} ，每個濃度進行 3 重複，分別建立此 4 種農藥之標準檢量線。分別取上述各農藥 $50 \mu\text{L}$ 逐一注入試劑組內已吸附此 4 種農藥抗體的微量孔盤中；再各別加入此 4 種農藥的農藥-酵素結合體，至含相應抗體的微量孔中，每孔 $50 \mu\text{L}$ ，於室溫靜置 30 min 後，甩掉微量孔盤中的反應液。每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 清洗液，於微量盤清洗儀中震盪 10 s、靜置 1 min、倒掉清洗液，重複 3 次。最後一次清洗後拍乾清洗液，加入 $100 \mu\text{L}$ 受質液，於室溫靜置 10 min，進行呈色反應。再於每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 終止液，終止反應，並以微量盤酵素免疫分析儀記錄 450 nm 波長的吸光值。

以上述各農藥進行 ELISA 後的吸光值為 B，對照組無放置農藥時吸光值為 B_0 ，計算吸光值抑制比 B/B_0 ，抑制率 = $(1 - B/B_0) \times 100\%$ 。將各農藥濃度取 log 值後，與其相應之吸光值抑制比進行直線回歸分析，得一直線回歸方程式。將抑制比 0.9 帶入此直線回歸方程式，計算出的農藥濃度，即為此農藥 ELISA 抑制率達 10% 時的農藥濃度 (10% inhibitory concentration; IC10)，即為檢測極限。農藥檢測範圍則為吸光值抑制比 0.2–0.8 間的農藥濃度。

交叉反應 (cross-reactivity; CR)

為確認此試劑組對 4 種標的農藥芬普尼、

亞滅培、達滅芬及得克利辨識力之專一性，依據農藥特性篩選待測農藥，包括與上述 4 種標的農藥結構相似的農藥，及與上述 4 種農藥結構相異之非標的農藥，全部共 49 類 93 種農藥，包括殺蟲劑、殺菌劑及除草劑等，詳如附錄。因為未來擬應用在農產品檢驗，故以商品農藥為測試標的，若為台灣已禁用、無法購得商品農藥，則改以高純度之農藥標準測試。

以交叉反應率檢視農藥抗體之專一性，交叉反應率 = (標的農藥之 IC50/非標的農藥之 IC50) $\times 100\%$ (Li *et al.* 2015)。當交叉反應率小於 0.1% 時，非標的農藥在此 ELISA 之 IC50 大於標的農藥 1,000 \times ，表示此標的農藥 ELISA 辨識力之專一性良好。故依據上述 4 種標的農藥的標準檢量線，推算各標的農藥在 50% 抑制率時的農藥濃度 (IC50)。將待測農藥的濃度配製為此濃度的 1,000 \times ，再以上述 ELISA 步驟進行反應，若 ELISA 之抑制率小於 50%，即表示此標的農藥 ELISA 與待測農藥之交叉反應率小於 0.1%。若 ELISA 之抑制率大於 50%，則將待測農藥配製多個濃度，進行 ELISA 後，建立其農藥濃度 log 值與吸光值抑制比間的回歸線，據以推算其 IC50，並根據上述公式算出交叉反應率。

植物檢體前處理與農藥回收率

參考芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組使用說明，以小松菜、紅蘿蔔、綠茶、山藥、南瓜等 5 種市售農產品進行農藥回收率測試，試驗檢體均為有機認證產品，並經水沖洗 10 min，每種農產品皆取樣 3 重複，小松菜每株為 1 重複，紅蘿蔔、山藥、南瓜每條為 1 重複，綠茶每罐為 1 重複。為確認此方法是否可檢測以農藥生化快篩法萃取之檢體萃取液，故取樣重量依據農藥生化快篩法 (Chiu *et al.* 1991) 調整，即小松菜 0.5 g，綠茶 1 g，紅蘿蔔、山藥、南瓜各 1.5 g。首先將各檢體切碎，放入直徑 1 cm、高 7 cm 之玻璃試管，分別加入 95% 乙醇 1 mL，再分別加入各配製成 50 mg L^{-1} 的芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利各 $10 \mu\text{L}$ ，使萃取液各含有 0.5 mg mL^{-1} 農藥，震盪 20 s 後靜置 3 min。從每管取出 $30 \mu\text{L}$ 酒精萃取液至另一新試管中，分別加

入 1,470 μL 萃取稀釋液。取前述萃取稀釋液各 50 μL 分別加入含此 4 種農藥抗體之微量孔盤，再個別加入此 4 種農藥之農藥-酵素結合體，每孔 50 μL ，其餘依前述 dcELISA 步驟進行反應，再經由上述建立之 4 種農藥的直線回歸方程式推算檢體所含農藥濃度，並據此計算農藥回收率。如以吸光值抑制比 B/B_0 與添加的農藥濃度 (log 值) 建立直線回歸方程式 $y = ax + b$ ，檢體萃取液中之農藥濃度 = POWER $\{(10, [(檢體的 B/B_0 值 - b)/ a])\}$ 。農藥回收率 = (檢體萃取液中之農藥濃度/實際添加之農藥濃度) $\times 100\%$ ，檢測方法可信度之管制範圍為 60–140% 農藥回收率 (Hsu *et al.* 2014)。

結果

dcELISA 之檢測極限

芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利等 4 種農藥各配製成 5 種濃度，進行直接競爭型 ELISA。各農藥與對照組之間的吸光值抑制比，

與相應各農藥濃度 log 值間的直線回歸分析如 (圖 1)， R^2 值皆在 0.9899–0.9948 間，可檢測範圍皆為 0.5–100 ng mL^{-1} 。各依其直線回歸方程式估算，芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利檢測極限 (IC10) 依序為 0.30、0.52、0.23 及 0.39 ng mL^{-1} 。

交叉反應

測試此試劑組所含之芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利等 4 種農藥抗體與 49 類 93 種農藥之交叉反應率，其中芬普尼抗體對與其化學結構相近的農藥益斯普之交叉反應率為 40.1%，亞滅培對與其結構相近的類尼古丁類藥劑賽果培、益達胺、賽速安、可尼丁之交叉反應率各為 47.6、31.3、1.0 及 0.8% (表 1)，除此之外，此 4 種農藥抗體對其餘農藥的交叉反應率皆小於 0.1%。顯示此試劑組對亞滅培、芬普尼、達滅芬及得克利農藥之專一性。

植物檢體前處理與農藥回收率

以此試劑組進行芬普尼、亞滅培、達滅芬

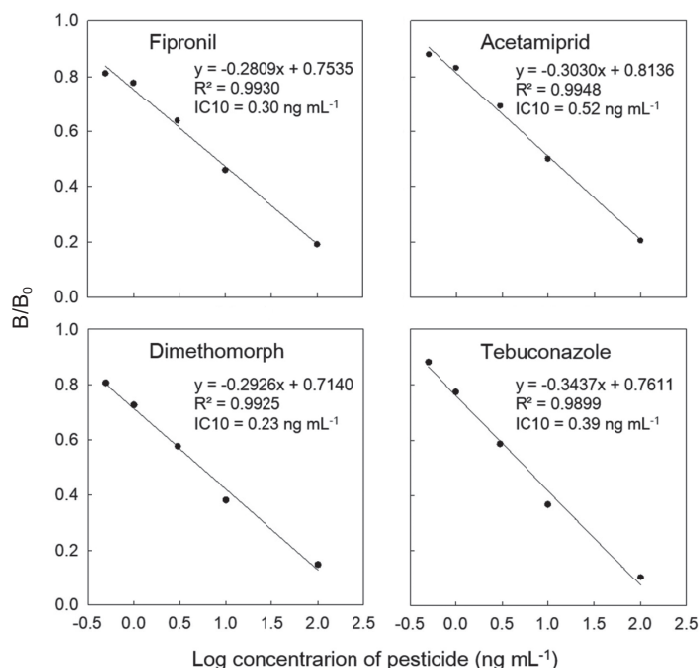


圖 1. 芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利之 dcELISA 抑制曲線。每個點為 3 個重複的平均值。

Fig. 1. Inhibition curves of fipronil, acetamiprid, dimethomorph and tebuconazole in the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA). Each point is the average of triplicate determinations. IC10: 10% inhibitory concentration.

表 1. 芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利抗體在直接競爭型酵素免疫分析中對其他非目標農藥之交叉反應。
Table 1. Cross-reactivity of the non-target pesticides to fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole antibodies in the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA).

Pesticide	Cross-reactivity (%) ^z			
	Fipronil	Acetamiprid	Dimethomorph	Tebuconazole
Phenylpyrazoles				
Fipronil	100.0	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Ethiprole	40.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Other 91 pesticides ^y	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Neonicotinoid				
Acetamiprid	< 0.1	100.0	< 0.1	< 0.1
Thiacloprid	< 0.1	47.6	< 0.1	< 0.1
Imidacloprid	< 0.1	31.3	< 0.1	< 0.1
Thiamethoxam	< 0.1	1.0	< 0.1	< 0.1
Clothianidin	< 0.1	0.8	< 0.1	< 0.1
Other 88 pesticides ^y	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Cinnamic acid amides				
Dimethomorph	< 0.1	< 0.1	100.0	< 0.1
Other 92 pesticides ^y	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Triazoles				
Tebuconazole	< 0.1	< 0.1	< 0.1	100.0
Other 92 pesticides ^y	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

^z Cross-reactivity was calculated as (IC50 of target pesticide/IC50 of other pesticide) × 100%. IC50: 50% inhibitory concentration.

^y Pesticides tested were listed in the appendix.

及得克利在小松菜、紅蘿蔔、綠茶、山藥、南瓜等 5 種農產品農藥回收率評估。取樣重量依據農藥生化快篩法調整，即小松菜 0.5 g，綠茶 1 g，紅蘿蔔、山藥、南瓜各 1.5 g，各加入乙醇 1 mL，每個檢體再加入上述 4 種農藥。檢測得知芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利在上述 5 種農產品上的回收率各為 73.1–123.6%，61.7–111.1%、72.5–102.3% 及 67.9–113.9%，各重複間之 CV 值皆小於 14.8% (表 2)。農藥回收率皆在 60–140% 管制範圍內，精確度與目前食藥署公告之檢驗方法相當 (Hsu *et al.* 2014)。

討論

芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組之檢測極限在 0.23–0.52 ng mL⁻¹ 之間，其靈敏度足以檢測國內訂定容許量 1 mg kg⁻¹ 之作物上的農藥。Watanabe *et al.* (2005) 評估克凡派 ELISA 試劑之檢測效

能，以含 5% 甲醇之水溶液配製克凡派各濃度，確認其 dcELISA 檢測範圍在 1–10 ng mL⁻¹，檢測極限為 0.1 ng mL⁻¹；Watanabe & Miyake (2013) 測試殺蟲劑賽速安 dcELISA 試劑組的檢測範圍為 0.1–4.1 ng mL⁻¹，檢測極限為 0.1 ng mL⁻¹；Liu *et al.* (2012) 研發數個可檢測有機磷劑類殺蟲劑的抗體，最靈敏的抗體對甲基巴拉松之抑制比 0.85 時的檢測濃度為 2.1 ng mL⁻¹。本研究測試芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利 4 合 1 農藥 ELISA 試劑組之檢測極限及檢測範圍皆與前述文獻相當。

在檢體處理方面，由於多數農藥非水溶性，現今國內農藥檢驗方法中的檢體處理多以有機溶劑萃取，但有機溶劑會對抗體蛋白質中的氫鍵等結構作用力產生影響，干擾農藥與抗體的鍵結，進而影響農藥 ELISA 時的靈敏度 (Yang *et al.* 2008)。農業試驗所研發的『農藥殘毒快速檢驗方法』即生化快篩法，則使用乙醇萃取農藥，對試驗操作者較為安全 (Chiu *et al.* 1991)。Watanabe *et al.* (2004, 2005) 測試萃取

表 2. 應用直接競爭型酵素免疫分析組檢測外加農藥於農產品上之農藥回收率。

Table 2. Recovery of the pesticides from agricultural samples with the direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA) kit.

Sample	Pesticide recovery rate (CV) (%) ^z			
	Fipronil	Acetamiprid	Dimethomorph	Tebuconazole
Komatsuna	105.3 (3.8)	74.0 (3.3)	92.8 (3.8)	92.1 (6.9)
Carrot	123.6 (5.7)	111.1 (6.2)	88.0 (6.0)	72.1 (5.3)
Yam	73.1 (5.3)	61.7 (4.0)	102.3 (4.9)	92.7 (3.7)
Pumpkin	98.6 (6.2)	73.8 (14.8)	72.5 (3.3)	113.9 (5.0)
Green tea	84.8 (2.1)	83.3 (6.7)	78.2 (6.9)	67.9 (6.7)

^z Pesticide recovery rate (%) = (pesticide detected in sample/pesticide added in sample) × 100%. CV: coefficient of variation.

液含 5% 甲醇、5% 乙醇、5% 丙酮、5% 乙腈 (acetonitrile) 等 4 種溶劑對克凡派 dcELISA 的影響，結果顯示甲醇與乙醇對農藥抗體與農藥間結合的量影響最小，可做為萃取用溶劑。前述文獻亦測試檢液含甲醇 1–30% 對殺菌劑四氯異苯腈 (chlorothalonil) ELISA 的影響，得知含甲醇量越高，吸光值越低，即對農藥抗體與農藥間結合的抑制越大，降低此 ELISA 檢測的靈敏度，濃度不宜高於 5%。本研究採用檢體前處理的方法係參考農業試驗所發展的生化快篩法，使用 95% 乙醇萃取農產品檢體上的農藥，為避免過高的乙醇成分干擾 ELISA，將此乙醇萃取液稀釋 50×，使萃取稀釋液僅含 1.9% 乙醇，再進行 ELISA，可避免有機溶劑對分析結果的干擾，同時也可降低檢體的基質干擾情形，使回推檢體上的農藥濃度更為準確。

檢測方法在檢體之檢測極限是指應用此方法在檢體上能檢測到的農藥最低濃度，此與檢體農藥萃取方法與後續萃取液的稀釋倍數有關。以小葉菜為例，此方法取 0.5 g 小葉菜，以 1 mL 乙醇萃取農藥，此時農藥濃度稀釋 2×，此萃取液再稀釋 50× 才進入 ELISA，檢體上的農藥濃度共稀釋 100×。根據前述芬普尼、亞滅培、達滅芬及得克利 dcELISA 之直線回歸方程式所推估出之檢測極限各為 0.30、0.52、0.23 及 0.39 ng mL⁻¹，加上此 100× 的稀釋倍數，可推估此方法檢測植物檢體中含上述 4 種農藥的檢測極限為 30、52、23 及 39 ng mL⁻¹，相當於 0.030、0.052、0.023 及 0.039

mg mL⁻¹。以達滅芬為例，多數作物的達滅芬殘留容許量在 1.0–10.0 ppm，相當於 1.0–10.0 mg mL⁻¹，應用此試劑組的檢測極限足以檢測小葉菜類含達滅芬的殘留。

農藥免疫檢測是應用抗體與抗原特異性結合的原理，所發展之新一代的農藥殘留快篩技術，應用直接競爭型 ELISA 搭配免疫分析儀，可一次同時檢測多件樣品。本研究測試芬普尼、亞滅培、達滅芬、得克利直接競爭型免疫檢測試劑組，評估其應用在小葉菜類的小松菜、根菜類的紅蘿蔔及山藥、瓜菜類的南瓜、茶類的綠茶等作物中殘留農藥的檢測可行性，結果顯示此 4 種農藥的回收率介於 61.7–123.6%，coefficient of variation (CV) 值介於 2.1–14.8%，具有穩定的回收率及良好的重複性。

農藥快篩方法是以快速、簡便、準確為發展原則，當精準的公告檢驗方法因為價格、設備、人力、耗時等限制，無法擴大抽驗數量時，農藥快篩方法包括免疫快篩及生化法皆可在農藥初篩階段發揮把關功能，大量且快速的攔截殘留農藥過量的農產品，提升公告檢驗方法效率。未來若能應用日益精進的分析技術，如微流體晶片技術、奈米免疫層析技術 (Khizar *et al.* 2020; Stueber *et al.* 2021; Wu *et al.* 2021, 2022)，縮減檢驗步驟，提升操作便利性，拓展可檢驗的農藥種類，當更能符合農產品農藥快篩應用需求。若再能連結以乙醯膽鹼酯酶為基礎的農藥快篩生化法，將更能擴大農藥快篩效能，提升農產品食用安全。

誌謝

本研究承行政院農業委員會 106 農科-12.2.4-農-C1 計畫經費補助。試驗期間承吳森源先生、朱雅琳小姐、蕭好芳小姐、楊侑綦小姐協助相關試驗執行，謹此致謝。

引用文獻

- Ann, P. J., J. N. Tsai, I. T. Wong, J. H. Huang, C. P. Lin, S. T. Wang, and C. K. Yang. 2015. Studies on phytophthora disease of amaranth and its control in Taiwan. p.13–22. *in*: Proceedings of the Symposium on Important New Emerging Crop Diseases in Taiwan and Their Controls. September 18, 2015. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)
- Brenneman, T. B. and A. K. Culbreath. 1994. Utilizing a sterol demethylation inhibiting fungicide in an advisory program to manage foliar and soilborne pathogens of peanut. *Plant Dis.* 78:866–872. doi:10.1094/PD-78-0866
- Chang, S. C., T. M. Chou, and C. H. Kao. 2016. Activities of the housefly acetylcholinesterase and its susceptibility to chlorpyrifos, chlorpyrifos oxon and propoxur. *Formosan Entomol.* 36:74–83. (in Chinese with English abstract) doi:10.6662/TFSE.2016009
- Chang, S. C., C. H. Kao, H. Shen-Tu, T. M. Chou, and S. C. Lo. 2018. Potential application of immunoassay for the detection of pesticide residues in agriculture. p.122–133. *in*: Proceedings of the 2018 International Symposium on Proactive Technologies for Enhancement of Integrated Pest Management of Key Crops. September 4–6, 2018. Taichung, Taiwan. Taiwan Agric. Res. Inst., Taichung, Taiwan.
- Cheng, E. Y., Y. B. Huang, M. Y. Chiang, Y. H. Hou, and C. C. Nien. 2015. The study of pesticide residues control by the combination of AChE screening and chemical analysis: The Taipei model. *J. Taiwan Agric. Res.* 64:53–63. (in Chinese with English abstract) doi:10.6156/JTAR/2015.06401.06
- 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. doi:10.29951/JARC.199106.0008
- Cohen, Y., A. Baider, and B. H. Cohen. 1995. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens. *Phytopathology* 85:1500–1506. doi:10.1094/Phyto-85-1500
- Hou, P. H., Y. C. Liao, Y. F. Tsai, C. H. Yang, F. M. Liu, Y. C. Huang, F. Chou, H. L. Tao, M. C. Lu, C. Y. Lu, P. Y. Chen, C. M. Chen, T. L. Chiu, and H. Y. Wang. 2019. Monitoring of pesticide residues in agricultural products on markets in 2018. *Ann. Rept. Food Drug Res.* 10:58–71. (in Chinese with English abstract)
- Hsu, Y. H., Y. H. Chen, M. C. Lin, H. F. Cheng, and D. Y. C. Shih. 2014. Survey on pesticide residues in raw materials of traditional Chinese medicines (X). *Ann. Rept. Food Drug Res.* 5:211–223. (in Chinese with English abstract)
- Kairo, G., Y. Poquet, H. Haji, S. Tchamitchian, M. Cousin, M. Bonnet, M. Pelissier, A. Kretzschmar, L. P. Belzunces, and J. L. Brunet. 2017. Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. *Environ. Toxicol. Chem.* 36:2345–2351. doi:10.1002/etc.3773
- Keinath, A. P. 2015. Efficacy of fungicides against powdery mildew on watermelon caused by *Podosphaera xanthii*. *Crop Prot.* 75:70–76. doi:10.1016/j.cropro.2015.05.013
- Khizar, S., H. Ben Halima, N. M. Ahmad, N. Zine, A. Errachid, and A. Elaissari. 2020. Magnetic nanoparticles in microfluidic and sensing: From transport to detection. *Electrophoresis* 41:1206–1224. doi:10.1002/elps.201900377
- Kranthi, K. R., M. Davis, C. D. Mayee, D. A. Russell, R. M. Shukla, U. Satija, M. Kshirsagar, D. Shiware, and S. Kranthi, 2009. Development of a colloidal-gold based lateral-flow immunoassay kit for ‘quality-control’ assessment of pyrethroid and endosulfan formulations in a novel single strip format. *Crop Prot.* 28:428–434. doi:10.1016/j.cropro.2009.01.003
- Li, X., H. Zhang, Y. Ji, Z. Zheng, Q. Bian, and G. Zhu. 2015. Immunochemical and molecular characteristics of monoclonal antibodies against organophosphorus pesticides and effect of hapten structures on immunoassay selectivity. *Food Agric. Immunol.* 26:109–119. doi:10.1080/09540105.2013.873390
- Liu, B., Y. Ge, Y. Zhang, Y. Song, Y. Lv, X. Wang, and S. Wang. 2012. Production of the class-specific antibody and development of direct competitive ELISA for multi-residue detection of organophosphorus pesticides. *Food Agric. Immunol.* 23:157–168. doi:10.1080/09540105.2011.608120
- Mayer, D. F. and J. D. Lunden. 1999. Field and laboratory tests of the effects of fipronil on adult female bees of *Apis mellifera*, *Megachile rotundata* and *Nomia melanderi*. *J. Apic. Res.* 38:191–197. doi:10.1080/0218839.1999.11101009

- Paul, P. A., P. E. Lipps, D. E. Hershman, M. P. McMullen, M. A. Draper, and L. V. Madden. 2007. A quantitative review of tebuconazole effect on Fusarium head blight and deoxynivalenol content in wheat. *Phytopathology* 97:211–220. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0211
- Reuveni, M. 1997. Post-infection applications of K_3PO_3 , phosphorous acid and dimethomorph inhibit development of downy mildew caused by *Plasmopara viticola* on grapevines. *J. Small Fruit Vitic.* 5(2):27–38. doi:10.1300/J065v05n02_03
- Rial-Otero, R., M. Arias-Estévez, E. López-Periago, B. Cancho-Grande, and J. Simal-Gándara. 2005. Variation in concentrations of the fungicides tebuconazole and dichlofluanid following successive applications to greenhouse-grown lettuces. *J. Agric. Food Chem.* 53:4471–4475. doi:10.1021/jf047848h
- Stueber, D. D., J. Villanova, I. Aponte, Z. Xiao, and V. L. Colvin. 2021. Magnetic nanoparticles in biology and medicine: Past, present, and future trends. *Pharmaceutics* 13:943. doi:10.3390/pharmaceutics13070943
- Tomizawa, M. and J. E. Casida. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45:247–268. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930
- Watanabe, E., H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, and M. Ueji. 2004. Evaluation and validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide imidacloprid in agricultural samples. *J. Agric. Food Chem.* 52:2756–2762. doi:10.1021/jf0498867
- Watanabe, E., K. Baba, H. Eun, T. Arao, Y. Ishii, M. Ueji, 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. Chromatogr. A* 1074:145–153. doi:10.1016/j.chroma.2005.03.100
- 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. doi:10.1007/s12161-012-9461-z
- Wong, F. P. and S. L. Midland. 2007. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. *Plant Dis.* 91:1547–1555. doi:10.1094/PDIS-91-12-1547
- Wu, K. H., W. C. Huang, S. C. Chang, C. H. Kao, and R. H. Shyu. 2021. Preparation of competitive immuno-chromatographic assay for detection of residual fipronil in urine and food samples. *Mater. Express* 11:63–72. doi:10.1166/mex.2021.1889
- Wu, K. H., W. C. Huang, S. C. Chang, and R. H. Shyu. 2022. Colloidal silver-based lateral flow immunoassay for detection of profenofos pesticide residue in vegetables. *RSC Adv.* 12:13035–13044. doi:10.1039/D2RA01654K
- Xu, X. F., T. Lin, S. K. Yuan, D. J. Dai, H. J. Shi, C. Q. Zhang, and H. D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. *Australas. Plant Pathol.* 43:605–613. doi:10.1007/s13313-014-0321-8
- Yamasaki, T., T. Inoue, Y. Hirakawa, S. Miyake, E. Ueno, and I. Saito. 2015. Validation of ELISA kits for pesticide residue analysis in vegetables and fruits. *J. Food Hyg. Saf.* 56:240–246. doi:10.3358/shokueishi.56.240
- Yang, T., W. G. Huangfu, and X. C. Xie. 2008. Indirect competitive ELISA (IC-ELISA) for multiresidues detection of the pyrethroids. *Food Sci. Technol.* 33:291–294. (in Chinese with English abstract)
- Yu, S. J. 2008. *The Toxicology and Biochemistry of Insecticides*. CRC Press. Boca Raton, FL. 296 pp. doi:10.1201/9781420059762

附錄。應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests.

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer	
Insecticide ²	1A	Carbofuran	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Methomyl	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Oxamyl	DuPont Taiwan Ltd.	
		Propoxur	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Carbaryl	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
	1B	Profenofos	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Acephate	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Fenitrothion	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Disulfoton	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Chlorpyrifos	Sinon Corp., Taiwan	
	2B	Fipronil	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Ethiprole	Sinon Corp., Taiwan.	
	3A	Cypermethrin	Sinon Corp., Taiwan.	
		Deltamethrin	Sinon Corp., Taiwan.	
		Fenvalerat	Sinon Corp., Taiwan.	
		Cyhalothrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		alpha-Cypermethrin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	
		Fenpropathrin	Sinon Corp., Taiwan.	
		Bifenthrin	Sinon Corp., Taiwan.	
		Permethrin	Sinon Corp., Taiwan.	
		4A	Acetamiprid	Sinon Corp., Taiwan.
			Imidacloprid	Bayer Taiwan Ltd.
	Thiamethoxam		Syngenta Taiwan Ltd.	
	Thiacloprid		Bayer Taiwan Ltd.	
	Clothianidin		Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.	
	Dinotefuran		Alfa Co., Taiwan Ltd.	
	5		Spinosad	Dow AgroSciences Taiwan Ltd.
		6	Abamectin	Sinon Corp., Taiwan.
			Emamectin benzoate	Syngenta Taiwan Ltd.
	7	Milbemectin	Mitsui-Chem., Taiwan Ltd.	
		Fenoxycarb	Agrowaho Co., Taiwan Ltd.	
	9	Pyriproxyfen	Sinon Corp., Taiwan.	
		Pymetrozine	Sinon Corp., Taiwan.	
	10A	Clofentezine	Lanlix Corp. Sci. Co., Taiwan Ltd.	
		Etoxazole	Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.	
	11	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Sumitomo Co., Taiwan Ltd.	
	12	Diafenthion	Sinon Corp., Taiwan.	
		Bromopropylate	Worldwide Agrochem. Co., Ltd.	
	13	Chlorfenapyr	BASF Taiwan Ltd.	
	14	Cartap hydrochloride	Sinon Corp., Taiwan.	

附錄．應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。(續)

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests. (continued)

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer
Fungicide ^y	15	Flufenoxuron	BASF Taiwan Ltd
		Teflubenzuron	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Chlorfluazuron	FMC Co., Taiwan Ltd.
	16	Buprofezin	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	17	Cyromazine	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	18	Tebufofenozide	Agrowaho Co., Taiwan Ltd.
	19	Amitraz	FMC Co., Taiwan Ltd.
	20B	Acequinocyl	Chia Tai Co., Taiwan Ltd.
	21A	Fenpyroximate	Nihon Nohyaku Co., Taiwan Ltd.
		Pyrimidifen	Sinon Corp., Taiwan.
		Tebufofenpyrad	HKC Co., Taiwan Ltd.
		Fenazaquin	Nihon Nohyaku Co., Taiwan Ltd.
	22A	Indoxacarb	FMC Co., Taiwan Ltd.
	23	Spirodiclofen	Bayer Taiwan Ltd.
	28	Chlorantraniliprole	FMC Co., Taiwan Ltd.
	UN	Dicofol	Harvest Chemical Co., Ltd.
		Bifenazate	United Phosphorus Ltd.
	B1	Carbendazim	Sinon Corp., Taiwan.
		Thiabendazole	Sinon Corp., Taiwan.
	B4	Pencycuron	HKC Co., Taiwan Ltd.
	C2	Oxycarboxin	Tong Ho Chem. Co., Taiwan Ltd.
		Boscalid	Dr. Ehrenstorfer GmbH
	C3	Pyraclostrobin	BASF Taiwan Ltd
		Trifloxystrobin	Bayer Taiwan Ltd.
		Kresoxim-methyl	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Azoxystrobin	Wonderful Agriculture Co., Ltd.
		Famoxadone Cymoxanil	DuPont Taiwan Ltd.
	C5	Fluazinam	Ya Chung Co., Taiwan Ltd.
	E1	Quinoxifen	Dow AgroSciences Taiwan Ltd.
	E2	Cyprodinil fludioxonil	Syngenta Taiwan Ltd.
	E3	Procymidone	Lih-Nung Co., Taiwan Ltd.
		Iprodione	Sinon Corp., Taiwan.
	F2	Edifenphos	Sinon Corp., Taiwan.
	F3	Etridiazole	United Phosphorus Ltd.
	G1	Tebuconazole	Bayer Taiwan Ltd.
		Difenoconazole	Sinon Corp., Taiwan.
		Hexaconazole	HKC Co., Taiwan Ltd
		Flutriafol	Dr. Ehrenstorfer GmbH
		Prochloraz	Sinon Corp., Taiwan.
	G2	Tridemorph	Alfa Co., Taiwan Ltd.

附錄。應用於交叉反應試驗之農藥含括 49 類共 93 種農藥。(續)

Appendix. Pesticides including 93 pesticides in 49 categories were used in the cross-reactivity tests. (continued)

Classification	Mode of action	Pesticide	Manufacturer
Herbicide ^x	H5	Dimethomorph	Sinon Corp., Taiwan.
	I1	Tricyclazole	Sinon Corp., Taiwan.
	M2	Sulfur	Sinon Corp., Taiwan.
	M3	Mancozeb	Sinon Corp., Taiwan.
	M5	Chlorothalonil	Ihara Chemical Co, Ltd.
	C1	Ametryn	Alfa Co., Taiwan Ltd.
	C2	Diuron	Wonderful Agriculture Co., Ltd.
	D	Paraquat	Sinon Corp., Taiwan.
	G	Glyphosate-isopropylammonium	Sinon Corp., Taiwan.
	H	Glufosinate ammonium	Sinon Corp., Taiwan.
	K1	Pendimethalin	Sinon Corp., Taiwan.
	K3	Butachlor	Sinon Corp., Taiwan.
	O	2,4-D	Sigma Aldrich

^z Including 57 pesticides in 24 categories by Insecticide Resistance Action Committee (IRAC).

^y Including 28 pesticides in 17 categories by Fungicide Resistance Action Committee (FRAC).

^x Including 8 pesticides in 8 categories by Herbicide Resistance Action Committee (HRAC).

Detection of Fipronil, Acetamiprid, Dimethomorph and Tebuconazole Residues in Agricultural Samples with Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Shu-Chen Chang^{1,*}, Hsuan Shentu², Ching-Hua Kao³, Shu-Chin Lo⁴, and Ming-Yao Chiang⁵

Abstract

Chang, S. C., H. Shentu, C. H. Kao, S. C. Lo, and M. Y. Chiang. 2022. Detection of fipronil, acetamiprid, dimethomorph and tebuconazole residues in agricultural samples with direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Taiwan Agric. Res.* 71(2):159–170.

In order to evaluate the rapid screening efficiency of pesticide immunoassay, a commercial direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA) was conducted to detect the residues of fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole in agricultural samples. The detectable range and the detection limit of these four pesticides by this dcELISA kit were 0.5–100 ng mL⁻¹ and 0.23–0.52 ng mL⁻¹, respectively. Agricultural samples such as komatsuna, carrots, green tea, pumpkin, and yam were chopped and each added with fipronil, acetamiprid, dimethomorph, and tebuconazole to 50 ng mL⁻¹. After extraction and dilution, residual pesticides were detected by dcELISA. The recovery rates of these four pesticides were 73.1–123.6%, 61.7–111.1%, 72.5–102.3% and 67.9–113.9%, respectively, which indicated immunoassay has high sensitivity and a good recovery rate. It takes only one hour from sample extraction to result interpretation, and is adequate for rapid screening of pesticide residues for agricultural products with high risk or known pesticide application records.

Key words: Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (dcELISA), Fipronil, Acetamiprid, Dimethomorph, Tebuconazole.

Received: October 17, 2021; Accepted: February 25, 2022.

* Corresponding author, e-mail: scchang@tari.gov.tw

¹ Associate Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

² Junior Technical Specialist, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC. Co-first author.

³ Former Research Fellow and Division Director, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁴ Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.

⁵ Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung City, Taiwan, ROC.