

# 以競爭性酵素連結免疫吸收劑快速分析蔬果中 Carbendazim、Benomyl、Thiabendazole 等農藥殘留

## Determination the pesticide residue of Carbendazim、Benomyl、 Thiabendazole in fruit by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay method

蔡琦  
Chi-Tsai

德育醫護管理專校

### 中文摘要：

由競爭性酵素連結免疫吸收劑分析法 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 在水溶液中定量貝芬替 Carbendazim、免賴得 Benomyl、腐絕 Thiabendazole 等農藥殘留已被發展出來。這分析法是利用兔子中抗貝芬替 Carbendazim 抗體附著在具有磁性的顆粒上，藉以分析貝芬替 Carbendazim、免賴得 Benomyl、腐絕 Thiabendazole 等農藥殘留，可測水中 Carbendazim 達到 0.1ppb 的檢出感度 (即 1mL 水中可測得  $1 \times 10^{-9}$  克之貝芬替 Carbendazim 殘留量)。由本實驗之結果得知本次試驗最低標準劑濃度 0.25ppb 貝芬替 Carbendazim，經測定所得 OD 吸光值 = 0.335，因此最低檢出感度至少可以達到 0.1ppb 的檢出感度，本試驗作三點濃度標準檢量線，線性迴歸關係  $R^2 = 0.99$ ，而抗體對抗原的結合性或辨視率有 90.1% 以上之信賴度，回收率達到有 82.0%，即有 82.0% 之方法準確性，亦即表示整個實驗有 82.0% 正確性。

### 中文摘要之關鍵詞：

關鍵詞 = 競爭性酵素連結免疫吸收劑分析法

關鍵詞 = 貝芬替

關鍵詞 = 免賴得

關鍵詞 = 腐絕

關鍵詞 = 酵素

關鍵詞 = 抗體

### 一、前言：

貝芬替 Carbendazim、免賴得 Benomyl 和腐絕 Thiabendazole 常被廣範使用當作內吸

性的殺真菌劑，用來控制易受真菌影響的水果、核果類、蔬菜、草皮和農作物。不僅在美國，超過 15 個國家在使用 Carbendazim 等農藥，經由水被植物吸收的特性，內吸性殺真菌劑可被植物的綠色組織細胞、葉子、根部所吸收。

A、貝芬替 (Bavistin, MBC, Carbendazim) 【3】

化學名稱：Methyl-2-benzimidazole carbamate or 2-(Methoxy-carbamyl)-benzimidazole

構造式： $C_9H_9N_5O_2$

毒性：急性口服半數致死量  $LD_{50}$  白鼠  $>6,400\text{mg/kg}$ ，兔  $>8,000\text{mg/kg}$ ，狗  $>8,000\text{mg/kg}$  (工業級)，經皮膚滲透  $LD_{50}$  白鼠  $>2,500\text{mg/kg}$ ，兔  $>4,000\text{mg/kg}$  (50% 製劑)。

B、免賴得 (Benomyl, Benlate) 【3】

化學名稱：1-(Butyl Carbamoyl)-2-benzimidazole Carbamic Acid, Methyl Ester or

Methyl-1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole Carbamate

構造式： $C_{14}H_{18}N_4O_3$

毒性：急性口服半數致死量  $LD_{50}$  白鼠  $>9,590\text{mg/kg}$ 。

C、腐絕 (Mertect, Thiabendazole, Thiabenzole) 【3】

化學名稱：2-(4-Thiazolyl)-benzimidazole(Thiabendazole)

構造式： $C_{14}H_{18}N_4O_3$

毒性：急性口服半數致死量  $LD_{50}$  白鼠  $>3,810\text{mg/kg}$ 。

二、材料：

A、試劑：【2】(試劑 1 至試劑 9 為 ELISA Kit 試劑組，由 Ohmicron Corp. 公司提供，有現成配好之試劑)

1、樣品：

I 待測樣品：葡萄

II 回收率樣品：5ppb 之回收率，即添加 50ng 於 10g 樣品中，  
最終濃度： $\text{conc} = (50\text{ng}/20\text{mL}) \times (4\text{mL}/2.5\text{mL}) = 4\text{ppb}$ 。

2、標準劑：

I. 0.25ppb Carbendazim 2mL/vial。

II. 1.00ppb Carbendazim 2mL/vial。

III. 5.00ppb Carbendazim 2mL/vial。

IV. 2.50ppb Carbendazim 2mL/vial。(當作控制組即所謂品管控制 Quality Control, QC 值，藉以測定實驗之可靠度及抗體對抗原之結合性或辨視率)

- 3、Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 酵素粉末：Carbendazim Hapten-horseradish peroxidase (HRP) enzyme conjugate (Sigma Chemical 公司提供) 500mg/vial。
- 4、Carbendazim Enzyme Conjugated 酵素粉末稀釋液：Buffered saline containing bovine serum albumin with preservative and stabilizers, 35mL/bottle。
- 5、Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑：實驗前把 Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 酵素粉末完全溶解在 35mL/bottle Carbendazim Enzyme Conjugated 酵素粉末稀釋液中，配好之 Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑有效期限 21 天。
- 6、Carbendazim Antibody Coupled Paramagnetic Particles：(Advanced Magnetic Inc. 公司提供) 結合磁粉粒子 magnetic particles 之 Carbendazim 抗體，65mL/bottle。
- 7、Washing Buffer：Tris-Buffered saline (pH 7.4) containing 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 0.1% BSA 用來稀釋 Carbendazim Antibody Coupled Paramagnetic Particles 和 Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑，250mL/bottle。
- 8、Diluent/Zero standard reagent (0.00ppb Carbendazim 2mL/vial)：即實驗時的 Bo 值，為空白標準，當做作 Maximum OD 值。
- 9、Color reagent：3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) / Hydrogen peroxide = 1 : 1 (v/v), 65mL/bottle。
- 10、Stopping Solution：終止反應試劑，成分為 0.5% 硫酸水溶液，60mL/bottle
- 11、Food Prepare Kit (Ohmicron Corp. 公司提供) containing adsorptive polymer。
- 12、Setpak Amino Phase (Aminopropyl Cartridge) 萃取淨化匣 1000mg/6mL ; C : 5.27% 。
- 13、CH<sub>3</sub>OH 殘留級。
- 14、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 殘留級。
- 15、去離子水。

#### B、裝置：

- 1、The magnetic separation rack (磁性盤)：(由 Ohmicron Corp. 公司提供)。
- 2、Microplate Reader：(MRX 由 Dynex Technologies, Inc. 公司提供)。
- 3、Micropipet (25-200uL 及 200-2000 uL)。
- 4、Vortex Mixer。
- 5、Test Tube：Polystyrene 10mL/tube。

#### 三、方法：

A、食品樣品前處理步驟：

- 1、

精稱	{	8 克 100% 純果汁 + 2mL Tris-Buffered saline (pH 7.4)。
		10 克水果 (其中含水約 8 克) + 2mL Tris-Buffered saline (pH 7.4)。
		2 克茶葉 + 2mL Tris-Buffered saline (pH 7.4) + 8 克 H <sub>2</sub> O。
- 2、加 2 克 NaCl 加入 20mL 丙酮，於離心瓶，均質、離心、靜置，均質瓶攪拌，再以離心機 3000rpm 轉速離心 5mins。
- 3、取其有機層 5mL，至 Food Prepare Kit 淨化，充份混合均勻 (去除有機酚)
- 4、取 4mL 以 0.45um 過濾，以 N<sub>2</sub> 吹乾。
- 5、加入 2mL 1% CH<sub>3</sub>OH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) 溶解步驟 4 吹乾之樣品，超音波振盪 5 至 10 分鐘。
- 6、以 2mL 1% CH<sub>3</sub>OH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) 潤濕 Aminopropyl Cartridge (NH<sub>2</sub> 萃取匣)，加入步驟 5 之溶液，以 2mL 1% CH<sub>3</sub>OH/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (v/v) 沖提三次，淨化去除色素，收集沖提液，以 N<sub>2</sub> 吹乾。
- 7、加 2.5mL 去離子水溶解。

B、競爭性酵素連結免疫吸收劑分析法 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)  
分析步驟：【2】

- 1、將空白、Diluent/Zero 標準品、標準品、控制組、樣品、回收率之試管標籤，並插入試管架上。
- 2、取 200uL 的 Diluent/Zero 標準品、標準品、控制組、樣品、回收率分別放入試管中，空白之試管加入 200uL 的去離子水。
- 3、加入 250uL 的 Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑到每一支試管 (除了空白之試管不添加 Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑)。
- 4、將 Carbendazim Antibody Coupled Paramagnetic Particles 徹底混合均勻，每一試管 (除了空白之試管不添加 Carbendazim Antibody Coupled Paramagnetic Particles) 加入 500uL。
- 5、Vortex mixing 1 至 2 秒。
- 6、在室溫下靜置 20 分鐘。
- 7、將試管連同試管架放置 The magnetic separation rack (磁性盤) 靜置分離 2 分鐘，使 Carbendazim Antibody Coupled Paramagnetic Particles 因磁性吸引附著在兩邊試管壁上。
- 8、不移開磁性盤，將試管連同試管架、磁性盤整體迅速並溫和反轉，將試管中的液體倒出。
- 9、加 1mL 的 Washing Buffer 至每一試管，並留置 2 分鐘。
- 10、如同步驟 8，將試管中的液體倒出。
- 11、重複步驟 9、10。
- 12、將 magnetic separation rack (磁性盤) 移開，並加入 500uL Color reagent

至每一支試管。

- 13、Vortex mixing 1 至 2 秒，儘量減少泡沫生成。
- 14、在室溫下靜置 20 分鐘，此時顏色漸呈藍色，而以 Diluent/Zero 標準品顏色最深，含 Carbendazim 濃度愈大反而顏色愈淺，呈淺藍色。
- 15、加入 500uL Stopping Solution 終止反應試劑至每一支試管，此時顏色立即變為黃色，含 Carbendazim 濃度由小到大，則顏色由深黃色至淺黃色。
- 16、取 200uL 的空白、Diluent/Zero 標準品、標準品、控制組、樣品、回收率分別放入 96wells/plate 中。
- 17、在 15 分鐘內以 450nm 讀取吸光值。

C、競爭性酵素連結免疫吸收劑分析法 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 分析原理：

利用磁性粒子表面結合兔子中抗貝芬替 Carbendazim 抗體，添加 Lyophilized Carbendazim Enzyme Conjugated 試劑後若此試管同時亦含有 Carbendazim 抗原時，Carbendazim Enzyme Conjugated 與 Carbendazim 會互相競爭與抗貝芬替 Carbendazim 抗體結合，而 Carbendazim 競爭力優於 Carbendazim Enzyme Conjugated，因為立體阻礙效應 stereo strain，因此 Carbendazim 會先佔據 Carbendazim 抗體上之活性位置 active site，等所有 Carbendazim 抗原都與其抗體結合之後，Carbendazim Enzyme Conjugated 才會結合上去，等所有活性位置 active site 都佔滿之後，試管中剩餘尚未結合部分

(Carbendazim Enzyme Conjugated)，必需以 Washing Buffer 洗掉，此時因抗體結合在磁性粒子上藉由磁性盤之磁性吸引，不被 Washing Buffer 洗掉，因為洗完之後，接下來只有末端含有酵素之 Carbendazim Enzyme Conjugated 會使 Color reagent 中 Chromogen 發色團產生顏色變化，所以當含 Carbendazim 濃度愈大反而顏色愈淺，因為當含 Carbendazim 濃度愈多則表示含 Carbendazim Enzyme Conjugated 濃度愈少，顏色也就愈淺，而加 Stopping Solution：終止反應試劑，成分為 0.5% 硫酸水溶液的用意是抑制酵素之活性，使其停止繼續作用，才不會影響 UV 吸光值的測定。

D、實驗之條件及參數設定：

Tube Number	Contents of Tube
1, 2	Diluent/Zero standard reagent (0.00ppb Carbendazim)
3, 4	Standard 1, (0.25ppb Carbendazim)
5, 6	Standard 2, (1.00ppb Carbendazim)
7, 8	Standard 3, (5.00ppb Carbendazim)
9	控制組, (2.50ppb Carbendazim)
10	Sample 1
11	Sample 1+回收率
12	Sample 2

線性迴歸：Linear/Log TYPE。

UV 吸收波長：450nm。

計算公式： $(\text{Sample}/\text{Bo}) \times 100$

E、數學計算方式：

本實驗數據計算方式：

本試驗方法採用二重複讀取 OD 吸光值，即每組濃度分別各自讀取 DATA(OD 值)再減去純空白 (背景值)，例如 B1、B2 之 well 表示值為已減去純空白 (背景值) 所得之結果 Bo1 各為 0.386 及 0.482，平均值為 0.434。

相對誤差率： $(|0.434-0.386|)/0.434=11.0\%$ 或 $(|0.434-0.482|)/0.434=11.0\%$

Bo1 為 Diluent/Zero standard reagent (0.00ppb Carbendazim 2mL/vial)，即實驗時的 Bo 值，為空白標準，當做作 Maximum OD 值，計算公式： $(\text{Sample}/\text{Bo}) \times 100$  中之分母。C1、C2 之 well 表示值為 S1，為 Standard 1, (0.25ppb Carbendazim) 所得之結果各為 0.335 及 0.385，平均值為 0.360。

相對誤差率： $(|0.360-0.335|)/0.360=6.9\%$ 或 $(|0.360-0.385|)/0.360=6.9\%$ 。

為計算公式： $(\text{Sample}/\text{Bo}) \times 100$  中之分子，代入公式  $(0.360/0.434) \times 100$  得 82.949 即為我們第一組 Standard 1, (0.25ppb Carbendazim) 之實驗數據 (X, Y) 值 = (0.25, 82.949)，同理第二組 Standard 2, (1.00ppb Carbendazim) 及第三組 Standard 3, (5.00ppb Carbendazim) 及控制組、樣品組和回收率組的算法比照前述算法，不再詳述。不過在取標準檢量線時採用半對數型態，即 Y 軸用十進位線性關係而 X 軸用 10 為基底之對數關係 (取 log 值) 如附圖二。事實上也就是求  $\log(X)$  對 Y 之檢量線得  $Y=69.7827-29.1928X$ ，R-SQR 值 = 0.99。

#### 四、 結果：

附圖圖一為 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法簡單示意圖，本實驗以 Microplate Reader : (MRX 由 Dynex Technologies, Inc. 公司提供) 為分析之儀器，一次可在 1 秒鐘之內讀取 (96wells/plate) 即 96 組 data，以避免時間之因素而造成 OD 吸光值衰減所產生之誤差，其每組 data 配置情形見附表一所示，附表一為雙座標之表示，第一個 well 為左上角位置，即代號為 A1，為了試驗之精確性，本試驗方法採用二重複讀取 OD 吸光值，A1、A2 之 well 表示值為 B1，B1 代表純空白 (背景值)，因此在計算時，所有 data 將扣除此一背景值 (B1)，以去除背景誤差。B1、B2 之 well 表示值為 Bo1，為 Diluent/Zero standard reagent (0.00ppb Carbendazim 2mL/vial)，即實驗時的 Bo 值，為空白標準，當做作 Maximum OD 值，計算公式： $(\text{Sample}/\text{Bo}) \times 100$ ，本試驗為競爭性酵素連結免疫吸收劑分析法 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)，所以 Bo 值是所以 data OD 吸光值最大值。C1、C2 之 well 表示值為 S1，為 Standard 1，(0.25ppb Carbendazim)。D1、D2 之 well 表示值為 S2，為 Standard 2，(1.00ppb Carbendazim)。E1、E2 之 well 表示值為 S3，為 Standard 3，(5.00ppb Carbendazim)。F1、F2 之 well 表示值為 C1，為控制組，(2.50ppb Carbendazim)，經計算結果為 2.27ppb，見附表二所示，因此  $2.27\text{ppb} \div 2.50\text{ppb} = 90.1\%$ ，表示此試驗條件有 90.1% 之準確性，此抗體對抗原的結合性或辨視率有 90.1% 以上之信賴度，因為尚需考慮 (藥劑、設備、儀器誤差) 及 (人為誤差)，所以此試驗之結果是可被接受，而這正是所謂 QC 值。G1、G2 之 well 表示值為 T1，為樣品組，(本樣品為葡萄，經檢測)，見附表二所示，本試驗設定濃度低於 0.24ppb 以下為 negative，0.25 以上為 positive，本試驗結果為 negative 即未檢出。H1、H2 之 well 表示值為 T2，為樣品 (葡萄) 5ppb 之回收率，即添加 50ng 於 10g 樣品中，最終濃度  $\text{conc} = (50\text{ng}/20\text{mL}) \times (4\text{mL}/2.5\text{mL}) = 4\text{ppb}$ ，見附表二所示，經計算結果為 3.28ppb，因此  $3.28\text{ppb} \div 4.00\text{ppb} = 82.0\%$ ，有 82.0% 之回收率，即有 82.0% 之方法準確性。根據附表二中之 S1、S2、S3 的 OD 吸光值，所得到之線性迴歸線，見附圖二所示，R-SQR 值 = 0.99，表示線性關係很好，所得之線性方程式  $Y = 69.7827 - 29.1928X$ 。

#### 五、 討論：

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法其回收率、精密度及準確度都有不錯的結果，可以篩選大量之樣品，實驗所花費的時間最少，不像傳統之 HPLC 液相層析法須費太多時間純化樣品，如附圖圖三為 HPLC 液相層析之標準檢量線及層析圖，HPLC 液相層析分析條件為 UV = 285nm、Column = C18、移動相採單一混合比例為 MeOH : H<sub>2</sub>O = 40 : 60 (V : V)、移動相流速 = 1.0mL/mins，由附圖圖三得知每組分析樣品間所分析的時間約 10 分鐘至 20 分鐘，假設取最短分析時間 10 分鐘，若分析 6 組樣品，若考慮每組二重複，就要分析 12 次即需 120 分鐘 (2 小時)，所需移動相溶劑約 120mins  $\times$  1.0mL/mins 為 120mL，而且由附圖圖三 HPLC 液相層析所偵測之感度無法達到 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法之感度，而 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法一次最多可讀取 96 組 DATA 只需幾分鐘的時間，且所需溶劑最少，由此可知 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 方法減少人力、物力資源的浪費，並符合經濟效益，並兼顧環境

保護，因此 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 是可以參考的方法。

#### 六、參考文獻：

1. Jeanne A. Itak, Michele Y. Selisker, Scott W. Jourdan, James R. Fleeker, and David P. Herzog "Determination of Benomyl (as Carbendazim) and Carbendazim in Water, Soil, and Fruit Juice by a Magnetic Particle-Based Immunoassay"—Journal of Agric. Food Chem. 1993, 41, 2329-2332。
2. Strategic Diagnostics Inc. "Benomyl/ Carbendazim RaPID Assay Kit procedure"。  
為  
OHMICRO ENVIRONMENTAL DIAGNOSTICS 公司所提供，其聯絡地址：375 Pheasant Run  
Newtown, PA 18940，TEL：(800) 544-8881，FAX (215) 860-5213
3. 廖龍盛編著"實用農藥"修訂第六版，華成印刷廠(台中市平等街一二二號)，內政部註冊著作權執照臺內著字第 2703 號。