

# 農藥中不純物之致變性篩檢

游 碧 堉

台灣省農業藥物毒物試驗所

## 一、前 言

爲了確保農藥使用之安全性，避免長期使用後對人畜及其他生物造成某些遺傳性疾病、腫瘤、或不孕等不可復原之慢性傷害，我國及世界各先進國家在農藥管理上，均要求審檢其致變異性（mutagenicity）資料，對於農藥原體主成份部份之致變異性，不難由登記註冊過程中得以掌握其毒理資料；而對於在農藥之製造過程當中，伴隨而生之副產物，或稱不純物，雖然其在農藥原體中所佔之比例很少，其致變異性資料仍不容被忽視。

有些農藥原體，其主成份本身雖不具致變性，但是其所含之不純物具致變異性，對生物仍具危險性。例如大克蟎農藥（Dicofol），在製程中會產生 17 種 DDT 類之不純物，對環境有不良影響；殺草劑二、四、五～三氯苯氧化乙酸（2,4,5-T）則因含戴奧辛（dioxin）不純物可能引致生產缺陷及流產，而被禁用。而有些農藥，亦可能由於合成途徑之不同而產生不同之不純物，因此，即使是相同主成份之不同製程的農藥，在安全管理上，亦有必要掌握其不純物之致變異性。

---

關鍵字：農藥原體、不純物、致變異性、回復突變測試、重組檢定、姊妹染色體交換、小核測試。

台灣省農業藥物毒物試驗所技術專刊第 24 號。

檢測農藥中不純物之致變性有二途徑可循：第一種是直接以化學分析方法，先測定農藥中不純物之種類、結構、與含量，然後檢索化合物之致變異性資料庫，查得這些不純物的致變異性。然而，並非所有化合物之致變異性資料皆可得自資料庫，而有些化合物也不是簡單之化學分析方法所能解決，而一次分析多種微量之未知化合物結構亦非易事。因此，第二種途徑是先不管農藥原體中究竟含有那些不純物，利用一些在短期內可測知化合物致變異性之簡速偵測法（short-term test）來篩檢農藥原體之致變異性，加以綜合評估，當結果為具致變性反應時，再以化學分析探究致變性不純物之種類、結構與含量，並加以去除。對於一些未知不純物結構與含量之農藥原體，利用生物檢定的方法篩檢其總合之致變異性，在時間、經濟與管理上，要比化學鑑定途徑方便些。

化合物致變異性簡速偵測法是由幾個致變的遺傳層面，如基因突變（gene mutation）、去氧核糖核酸破壞與修復（DNA damage and repair）、染色體變異（chromosome aberration），乃至致癌基因轉形（oncogenic transformation）等，截取一定的標竿（end-point）來測試化合物之致變異性。為免以偏概全，乃採取幾個致變的遺傳層面，依人力、財力狀況各選取一至數個方法綜合篩檢評估化合物之致變異性。而測試之生物材料，由低等之微生物試管測試階級，乃至高等哺乳動物之生體內測試階級，甚而直接以人體細胞之組織培養皆有。目前已有一、兩百種方法發展出來，其中有數十種已經美國環境保護署（U. S. Environmental Protection Agency, USEPA）評估考量採用。對於農藥原體主成份部份，要求之致變異性測試項目（如表一）頗多，原則上，在涵蓋致基因突變、核酸修復及染色體變異等三個遺傳毒性層面上，需包括至哺乳動物生體內之試驗。而對於不純物部份，原則上，仍涵蓋上述三個遺傳毒性層面，可以微生物測試系統加以篩檢。

較為常用之簡速偵測法有：(一)沙門菌回復突變測試法（*Salmonella*

表一、美國環境保護署對於農藥致變異性測定之要求

測試遺傳層面	測試材料與方法	備	註
<p>致基因突變： (Gene mutation) 至少需包括右列 1 ~ 5 項目中，三種 以上的方法。</p>	<p>1. 測試細菌的基因突變 (如 Ames test)。</p> <p>2. 測試昆蟲的基因突變 (如 SLRL test)</p> <p>3. 測試真菌的基因突變 (如 yeast forward-mutation)。</p> <p>4. 測試哺乳動物細胞之組織 培養的基因突變 (如 L5178TK + / - forward mutation)。</p> <p>5. 測試哺乳動物之基因突變 (如 spot test)。</p>	<p>所使用之菌種要能測出氮鹼 基置換與框構位移突變，且 需包括代謝活化系統。</p> <p>推薦果蠅之性連隱性致死試 驗。</p> <p>使用之菌種需能測出氮鹼基 置換與框構位移突變，亦需 使用代謝活化系統。常用之 生物有紅麵包、麵包黴、酵 母菌等。</p> <p>需加代謝活化系統。</p>	
<p>測定染色體突變： (Heritable chromo- somal mutation) 至少需包括右列 6 ~ 9 項目中，三 種以上的方法。</p>	<p>6. 哺乳動物生體內之細胞遺 傳測定 (如 micronucleus test)。</p> <p>7. 昆蟲之測試 (如 domi- nant lethal test)。</p> <p>8. 白鼠之顯性致死 (domi- nant lethal test in mice)。</p> <p>9. 哺乳動物之可遺傳性染色 體易位測試 (如 heritable translocation test)。</p>	<p>推薦使用鰐鼠之基因座專有 性測試 (mouse specific lo- cus mutation)。</p> <p>測試之體細胞可取骨髓細胞 或取睪丸之生殖細胞為材料。</p> <p>推薦使用果蠅為材料。</p> <p>測試劑量應參照人類之可能 曝露量。</p> <p>需各別測試雌雄之不孕性。</p>	
<p>測試核酸修復或重 組：(DNA repair / recombination) 至少需包括右列 10 ~ 13 項中之兩 項以上的試驗。</p>	<p>10. 細菌的核酸修復 (如 rec assay)。</p> <p>11. 哺乳動物組織培養之期外 去氧核糖核酸修復試驗 (UDS)。</p> <p>12. 測試真菌之基因危害 (如 yeast gene conversion)。</p> <p>13. 哺乳動物細胞組織培養之 姊妹染色分體交換(SCE)。</p>	<p>選定之菌種需帶有標誌 (marker)。</p> <p>推薦使用人類細胞之組織培 養，至少包括具殺傷力在內 的五個測試劑量。</p> <p>測試雙套染色體酵母菌之有 絲交換或基因轉換。</p> <p>測試之細胞要求在指數生長 期條件下，經過兩個世代。</p>	

reversion assay, 即 Ames test ) ; (二) 枯草菌重組檢定試驗 ( *Bacillus* recombination assay, 簡稱 rec assay ) ; (三) 倉鼠細胞培養之姊妹染色體交換試驗 ( Sister chromatid exchanges assay in Chinese hamster ovary cells, 簡稱 SCE ) ; 以及 (四) 小鼠骨髓細胞之小核測試法 ( Micronucleus test in mouse bone marrow cells ) 等。

## 二、材料與方法

### (一) 供試農藥原體：

測試藥劑先以無菌水 ( 非水溶性藥劑則以 dimethyl sulfoxide, DMSO 助溶 ) 配製 10mg/ml 濃度之儲存溶液 ( stock solution ) , 試驗時, 再以緩衝溶液 ( buffer solution ) 連續稀釋四個以上之等比濃度溶液進行測試, 唯試驗時, 溶液中之溶劑含量不得超過 1% 。

測試之最高劑量可以最低致死劑量之一半或測試化合物之最高溶解度為上限 ( 一般約為 1000ug/ml ) , 在其以下之一千倍稀釋濃度範圍內, 以三或五倍之連續稀釋液進行致變異性試驗, 各處理劑量之重複數因各致變性試驗方法而不同。

### (二) 肝臟酵素活化處理：

由於諸多致變異性簡速偵測法均在生體外 ( *in vitro* ) 進行, 為模擬藥劑在生體內 ( *in vivo* ) 之可能代謝後的反應, 所有測試藥劑除了直接試驗之外, 一般多以白鼠肝臟酵素抽出液系統 ( S9 activation system ) 與藥劑反應後再行致變異性測試。

### (三) 對照處理：

各化合物進行致變異性試驗之同時, 皆應包括：1. 無藥劑處理對照, 以隨時檢視供試生物材料之穩定性；2. 溶劑負反應對照：通常以配藥時使用之溶劑 ( 如 DMSO ) 1% 濃度為負反應對照；以及 3. 正反應對照：在不加肝臟酵素活化處理組, 可以 4-nitroquinoline-N-oxide ( NQO ), mitomycin

C, ethyl methanesulfonate ( EMS ), 或 methyl methanesulfonate ( MMS ) 等已知之致變劑為正對照；而在加肝臟酵素活化處理組，可以 2-aminofluorene ( 2AF ), cyclophosphamide ( CP ) 等作為正對照，以隨時檢定試驗之可靠性。

#### ④致變異性試驗：

1. 沙門菌回復突變測試 ( *Salmonella* reversion assay, Ames test ) 以 *S. typhimurium* TA98 及 TA100 菌種為材料，測試藥劑在框構位移 ( frameshift ) 及氮基置換 ( basepair substitution ) 機制上之基因突變反應，操作步驟依 Dr. Maron & Ames ( 1983 ) 之方法，分別以直接反應及加肝臟酵素活化反應，測試農藥之致變異性。試驗時以 4-NQO 及 2AF 分別為不加及加肝臟酵素活化處理之正反應對照。
2. 枯草桿菌重組檢定試驗 ( Rec assay )：以 *B. subtilis* H17 ( rec + ) 及 M45 ( rec - ) 為材料，由兩菌種之核酸重組表現之差異測試藥劑對菌種 DNA 之破壞潛力，操作步驟依 Dr. Kada 等 ( 1980 ) 之方法，測試農藥之致變異性。試驗時以 mitomycin C 及 2AF 分別為不加與加肝臟酵素活化處理之正反應對照。
3. 倉鼠細胞培養之姊妹染色體交換試驗 ( SCE in CHO )：以中國倉鼠卵巢細胞 ( Chinese hamster ovary, CHO ) 為材料，測試農藥對哺乳動物細胞之染色體之切補影響。測試農藥先依 Dr. Mitchell 等 ( 1981 ) 之方法測試其對培養細胞之殺傷力，選擇適當之測試劑量後，再參照 Dr. Jan 等 ( 1981 ) 之方法，測試農藥之致變異性。試驗時以 EMS 與 CP 分別為不加與加肝臟酵素活化處理之正反應對照。
4. 小鼠骨髓細胞之小核變異測試 ( Micronucleus test )：以 ICR 品系之小鼠 ( *Mus musculus* ) 為供試材料，測試農藥在生體內對哺乳動物之染色體或有絲分裂器 ( mitotic apparatus ) 的傷害。依 Dr. Heddle & Schmid 所發展之方法，將農藥經口服 ( *per os* ) 或腹腔注射 ( intraperitoneal, IP ) 處理小鼠後，觀察其骨髓內之新生紅血球細胞中，

發生不正常小核 ( micronucleus ) 之頻率，而測知化合物對染色體或有絲分裂結構的破壞能力。試驗時以 EMS, CP 及 7, 12 - dimethylbenzanthracene 分別作為藥劑處理後第 24、48 及 72 小時之正反應對照。

### 三、結果與討論

農藥原體中不純物之致變異性篩檢策略，可先採取上述之前三種生體外之試驗方法，先行篩檢。若得正反應結果，可初步了解其在遺傳毒性上之致變層面。而如小核測試或其它染色體變異等之生體內試驗，可作為後繼之確證試驗 ( confirmation test )，可更完整掌握其致變潛力。而對於具致變異性不純物之農藥原體，若不限制使用，應進一步分析究為何種不純物所致，並加以分離除去，以確保農藥使用之安全性。

由於生體外之致變異性簡速偵測法皆為片面之遺傳毒性檢測原則，因此，在不同遺傳層面所測得之反應結果未必一致。一般而言，當三種遺傳毒性層面之測試結果中，有兩個以上測得正反應結果，通常認定該測試藥劑具致變異性，必需進行危機率評估 ( risk assessment )，考量該藥劑之毒性及在環境之曝露情形而加以管理使用；或者以物理化學方法分析該藥劑之不純物種類與含量，各成份再各別進行致變異性檢測，找出究為何種不純物所致，並加以去除。至於應採取何種手段，則端視該藥劑之經濟效益而定。

當三種生體外之測試結果，只有一種得正反應結果時，可就得正反應結果之遺傳毒性層面，再以較高生物層次之試驗材料，如哺乳動物細胞培養等，再繼續檢測其致變異性。例如，某藥劑在上述三種生體外之測試結果中，在沙門菌回復突變與姊妹染色體交換試驗得負反應；而重組檢定得正反應結果時，可再選擇鼠類細胞或人體細胞培養之期外核酸合成試驗 ( unschedule DNA synthesis, UDS assay )，再測試該藥劑之致變異性，以確定該藥劑是否對生物之核酸造成傷害，或是其在重組檢定試驗

中為偽正反應結果 ( false positive ) 所致。

#### 四、結論與建議

以幾種生體外之簡速偵測法綜合篩檢農藥中不純物致變異性之策略，微生物測試系統固然既經濟又快速，但是其偽正反應結果比例亦高，與人體危機率評估之間差距亦大，直接以哺乳動物進行生體內之試驗結果固然與人體之危機率評估較為相近，然而由於所費不貲，試驗時間既長，而且近幾年來受保護動物聲浪影響，因此，以哺乳動物細胞尤其是人體細胞培養為材料之試驗方法漸為時勢所趨。

由於致變異性簡速偵測法在近十年來之進展很快，已有一、兩百種測試方法發展，且已有上千種之化合物經各種不同測試方法篩檢過，許多國家皆建有豐富之資料庫可供查詢。因此，今後之農藥原體中不純物之致變異性篩檢工作，可以不必以生物檢定的方式加以一一篩檢，將測試農藥，直接以物理化學方法，分析農藥中之各成份與含量，直接核對化合物致變異性之資料庫，加以評估，將會比較經濟。唯對於未知致變異性之化合物仍需進行致變異性綜合篩檢，以確保農藥使用之安全性。

#### 五、參考文獻

1. Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki and F. D. Lee. ( 1973 ) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70(8):2281-2285.
2. Bridges, B. A. ( 1976 ) Short term screening tests for carcinogens. Nature, 261:195-200.
3. Brusick, D. ( 1980 ) Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press. New York and London. 279pp.
4. Butterworth, B. E. ( 1979 ) Strategies for short-term testing for

- mutagens/carcinogens. CRC Press. 134pp.
5. Heddle, J. A., M. Hite, B. Kirkhart, K. Mavournin, J. T. MacGregor, G. W. Newell and M. F. Salmone. ( 1983 ) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 123:61-118.
  6. Jan, K. Y., W. W. Sheng and W. N. Wen. ( 1982 ) A simplified fluorescence plus giemsa method for consistent differential staining of sister chromatid. *Stain Tech.* 57(1):45-46.
  7. Jenssen, D. and C. Ramel. ( 1980 ) The micronucleus test as part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat. Res.*, 75:191-202.
  8. Kada, T., K. Hirano and Y. Shirasu. ( 1980 ) Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. In "Chemical mutagens: principles and methods for their detection." pp.149-173. de Serres F. J. and A. Hollaender eds. Vol. 6. Plenum Press. New York and London. 485pp.
  9. Latt, S. A., J. Allen, S. E. Bloom, A. Carrano, E. Falk, D. Fram, E. Schneider, R. Schreck, R. Tice, B. Whitfield and S. Wolff. ( 1981 ) Sister-chromatid exchanges: A report of the U. S. EPA gene-tox program. *Mutat. Res.*, 87:17-62.
  10. Maron, D. M. and B. N. Ames. ( 1983 ) Revised method for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. res.*, 113:173-215.
  11. Mitchell, G. A., K. M. Meher-Homji and R. S. U. Baker. ( 1981 ) Sister chromatid exchanges: prescreening of chemicals for subtoxic levels. *Med. Lab. Sci.*, 38:117-119.
  12. Rothman, A. M. ( 1980 ) High performance liquid chromatographic analysis of dicofol acaricide. *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 63(6):1296-1299.
  13. U. S. EPA. ( 1982 ) Health effects test guidelines and support documents. Office of Toxic Substances. U. W. EPA. Washington D. C. 432pp.