

國際上植物代謝研究於農藥登記資料要求之介紹

鄭惠元¹、楊舒涵¹、鄭美惠¹、徐慈鴻^{1*}

摘要

鄭惠元、楊舒涵、鄭美惠、徐慈鴻。2021。國際上植物代謝研究於農藥登記資料要求之介紹。臺灣農藥科學 10 : 29-47。

植物代謝研究為農藥登記申請時必須繳交的基本資料之一，主要目的是瞭解農藥以擬登記使用方法施用後，於植物體各部位的殘留分布、殘留組成及代謝途徑，我國現行法規針對植物代謝試驗參照經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 之規範。OECD 編號 TG501 植物代謝試驗準則中敘明，對於作物中測得的總放射性殘留量應盡可能鑑定 (identify) 或鑑別 (characterize) 所有的殘留組成分，但實際上會受到許多因素影響難以達成，準則中針對作物、作物類別、同位素標定、施藥參數、試驗設施、作物採樣部位、殘留量的鑑定與鑑別、無法萃取量的處理及儲存穩定性試驗等均有相應的規範說明。國際上近年修訂植物代謝試驗相關準則大多朝向與 OECD 試驗準則調和後訂定 (如日本及中國)。植物代謝資料為評估作物中殘留定義最主要的科學佐證資料之一，也是作為決定分析方法開發需納入何種分析成分之基礎資料，此外，辨別未於動物代謝產生的植體代謝物，亦是後續研究的重要任務。本文著重介紹 OECD 植物代謝試驗準則及植物代謝資料的審查考量，期外界對於農藥登記有關植物代謝內容有進一步的認識，有助於農藥登記資料審查及申請者備審工作，也可提供我國未來法規研訂之參考。

關鍵詞：植物代謝、農藥登記、殘留定義、殘留分布、總放射性殘留量

接受日期：2021 年 8 月 9 日

* 通訊作者。E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

緒言

植物體的水分及養分運輸透過兩大維管組織進行，一是由導管組成的木質部，主要運輸水分，利用蒸散作用由根部向上輸送至莖葉，另一為由篩管組成的韌皮部，主要運輸養分，為雙向運輸，農藥施用後亦是透過這些維管組織於植物體中分布及降解。農藥有效成分 (active ingredient) 在植物體代謝是一個複雜的過程，透過葉片表面、果實或根部吸收，於植體分布、蒸散、降解、轉化及代謝，代謝研究可提供殘留組成的定性及半定量結果，以利推測於植體可能的殘留樣態 (residue behavior) 及不同組織部位的殘留分布⁽⁶⁾。影響農藥有效成分於植物體代謝的因素很多，包含溫度、溼度、光照、土壤組成、作物吸收、有效成分於作物中移動性、於土壤中持久性及移動性等⁽⁸⁾。由於農藥有效成分的特性差異，在不同植物體滲透程度亦不盡相同，導致農藥於植物體代謝結果不同，農藥有效成分經由植物地上部及根的吸收、蒸散作用或降雨沖洗 (主要為地上部)，隨時間部分降解⁽¹⁵⁾。葉及根是農藥有效成分產生降解作用的主要位置⁽⁹⁾。

植物代謝研究主要是瞭解農藥施用後於植物體的分布情形，利用放射性同位素標定追蹤農藥有效成分的變化，分析作物於採收期之果實、葉部、穀粒或其他部位中之總放射性殘留量 (total radioactive residue, TRR)，並鑑別農藥產生之轉化產物 (transformation product)，如代謝物、

化學反應產物或光解產物 (photolysis product) 等⁽⁶⁾，研究過程十分複雜且相關技術不斷精進，執行試驗時應使用最新技術並說明引用來源。測定總放射性殘留量的方式常是將樣品燃燒分析 (combustion) 並測定釋放出的二氧化碳中的 ^{14}C ，亦有透過不同溶劑萃取及無法萃取量處理方式將測得放射性殘留量加總。植物代謝研究可探討問題包含農藥施用於作物後，於食用部位及非食用部位的殘留量多寡為何？殘留組成包含哪些化合物？土壤處理是否會透過根部吸收運輸至葉片或果實導致殘留？葉面施用是否會透過葉片吸收運輸至根部導致殘留？若為皮不可食類果實，主要殘留於表面或滲透至果肉？可依據欲探討議題規劃試驗。綜合以上，農藥之植物代謝研究主要目的可歸納為探討農藥以擬登記之使用方法施用於作物或土壤後，該藥劑有效成分在作物各部位的總殘留量分布情形、作物採收時在食用部位的殘留組成，以及在作物體內的代謝或降解途徑等。以下將先說明 OECD 的植物代謝試驗準則內容，接著簡介美國、日本、歐盟、中國等國家或組織在農藥登記時所提供的植物代謝相關要求，並進一步說明植物代謝資料審查之綜合考量，期作為我國未來相關法規研訂之參考。

農藥於植物體的代謝途徑

當農藥噴灑於植株時，葉片是吸收農藥的主要部位，藥液由葉面承接而停留於

表面，部分由葉表皮蠟質滲透入植物細胞中，再透過原生細胞壁、次級細胞壁及細胞質膜運輸至原生質體，部分化合物於運輸過程被酵素水解^(7, 10, 14)，上述農藥於植物體的代謝過程可能使農藥有效成分的結構發生變化，通常是朝向更具水溶性或低毒性結構改變，亦可稱為生物轉化 (biotransformation) 過程。當農藥的施用方法為土壤處理時，植物吸收農藥的主要部位則為根部，土壤中的藥液由植株的根冠及根毛吸收，於根部轉化再向上運輸至其他部位⁽¹³⁾。農藥於植體內之運輸方式依據不同農藥特性分為於原生質絲 (plasmodesmata) 內的短距離運輸及藉由維管系統的長距離運輸，後者被認為較偏屬系統性運輸⁽¹⁴⁾。

動物體內通過特定器官 (如肝臟) 與排泄系統逐步代謝及排除外來物質 (xenobiotics)，由於植物體並無排毒器官及排泄系統，因此植物體對於外來物質的代謝速度較慢，最終降解產物常以共軛物和/或衍生物的形式儲存於植體內或降解進入植體循環⁽¹⁴⁾。代謝的作用方式包含氧化 (oxidation)、還原 (reduction)、水解 (hydrolysis) 及共軛 (conjugation)，視斷裂位置或鍵結官能基不同又可再細分 (表一)，通常動植物體代謝途徑於氧化、還原及水解等作用在定性上相似，但於共軛作用則不盡相同⁽¹⁴⁾。一般來說，農藥於植物體的代謝途徑可能包含 3 個階段，第一階段為改變化學物質的結構，透過氧化、還原及水解等反應而生成官能基，反應過

程大多有酵素催化，通常使結構朝向水溶性或降低毒性並有利於進入下一階段，於第二階段再與植體內生化合物 (endogenous compound) 如醣類或胺基酸等結合形成較為極性的共軛結構，此階段形成的化合物通常對植物的毒性很低且較易儲存於植物胞器，部分化合物會持續代謝，於第三階段進行二次共軛 (secondary conjugation)，可能與植體中木質素或細胞壁形成穩定的鍵結 (bond residue)，或與醣類或胺基酸形成共軛物進入液泡或沈積於細胞外^(11, 19, 22)。農藥於植物體常見的代謝途徑如表一。

OECD 植物代謝試驗準則介紹

植物代謝研究的主要目的為瞭解農藥有效成分代謝後於作物之殘留分布、殘留組成及代謝途徑。OECD 編號 TG501 植物代謝試驗準則⁽¹⁶⁾的章節包含緒言、目的、基本考量、作物類別、採收後處理、基因改造作物、同位素標定、施藥參數、試驗設施、作物採樣部位、樣品分析、可萃取殘留量及無法萃取量的鑑定 (identification) 與鑑別 (characterization)、儲存穩定性試驗、試驗報告中應呈現的數據及內容等，以下將準則內容概分幾個重要部分說明：

一、作物及作物類別

植物代謝的作物類別與田間殘留試驗的作物分群不同，植物代謝 5 大作物類別

包含穀類、乾豆油籽類、葉菜類、根菜類及果實類 (表二)，選擇 1 種作物即可代表該作物類別之植體代謝情形。若僅登記於 1 種作物類別，只要提交的作物足以代表該類別並已闡明代謝途徑即可，若需推估至所有作物範圍，則需至少提交 5 大作物類別中的 3 種類別的作物來進行試驗，若所提交的 3 種類別作物之代謝途徑有落差，應再補充其他類別之代謝試驗資料，反之則不需再提交其他代謝試驗資料。相

同代謝途徑下所產生代謝物殘留量的差異，通常不需再進行其他試驗。若擬登記作物為特殊作物及／或具有特殊生長條件，即使已有 3 種類別作物之植物代謝試驗，仍需額外進行該作物之代謝研究，以水稻為例，由於水稻之農藝栽培條件與其他穀類作物不同，雖然穀類作物的代謝結果可推估至包括旱稻在內的多數穀類作物，但無法推估於水稻植體中的代謝情形⁽¹⁷⁾，因此若農藥申請登記使用於水稻，需

表一、農藥於植物體常見的代謝途徑^(11, 14, 19, 22)

Table 1. Common metabolic pathways of pesticides in plants^(11, 14, 19, 22)

Phase	Reaction	Example
	Oxidation	
	hydroxylation	bifenthrin → 4-OH-bifenthrin
	dealkylation	carbosulfan → carbofuran
	oxidative deamination	metribuzin → DADK ¹⁾
	sulfoxidation	clethodim → clethodim sulfoxide → clethodim sulfone
	desulfuration	dimethoate → omethoate
	epoxidation	captan → captan epoxide
Phase I	Reduction	
	nitroreduction	parathion → amino parathion
	other reduction	triadimefon → triadimenol
	Hydrolysis	
	ester	MCPB-ethyl → MCPB
	amide	acephate → methamidophos
	nitrile	sulfoxaflor → X11719474 ²⁾
	other cleavage	captan → THPI ³⁾ + thiophosgene
Phase II	Conjugation	
	glucose	2,4-D → 2,4-DCP glucose conjugate
	amino acid	atrazine → atrazine glutathione conjugate
Phase III	Secondary conjugation	
	glucose	sulfoxaflor → X11863595 ⁴⁾
	malonate	fenpropimorph → fenpropimorph-malonylglucoside

¹⁾ 6-*tert*-butyl-1,2,4-triazin-3,5(2*H*,4*H*)-dione

²⁾ 1-[methyl(oxido){1-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]ethyl}-λ⁶-sulfanylidene]urea

³⁾ 1,2,3,6-tetrahydrophthalimide

⁴⁾ 1-[6-(trifluoromethyl)pyridin-3-yl]-D-glucopyranoside (Glucose conjugate of X11721061)

額外進行水稻的代謝試驗。此外，未列於表二作物類別表中之作物，其試驗資料無法用於推估至所有作物範圍。若某作物為該國家／地區之重要農產品，而需以該作物的植物代謝資料作為必須提交的 3 類別作物之一時，應事先與主管機關確認。此外，當作物為涉及插入抗性基因的基因改造作物時，需進行 1 種基因改造作物的植物代謝試驗研究，且在代謝結果與非基因改造作物不相同時需補足至少 3 類別基因改造作物之植物代謝試驗。

二、施藥參數

植物代謝研究目的是為了反映農藥在擬登記使用方法下於植物體代謝之結果，試驗規劃需可反映擬登記之使用方式 (如植株噴施、土壤／種子處理、採收後處理)、施藥量、施藥間期及施藥次數等，並盡可能以實際會在田間施用的農藥成品執行，若直接以農藥原體進行試驗應提出合理的說明。舉例來說，若已完成 3 種作物類別以上的植株噴施之植物代謝研究，但擬登記使用方法亦有土壤處理的施藥方式，則應再進行至少 1 種作物類別於土壤處理之植體代謝試驗，若植體代謝結果不同亦應補足 3 種作物類別。

進行施藥處理時，原則上應以擬登記使用方法之最大施藥劑量來規劃試驗，但在某些情況下，可適度調整施藥次數或施藥劑量：

1. 施藥次數：當擬登記施藥次數超過 3 次

時，只要施藥期間小於 3 個月且採樣時間符合正常採收期，每次施藥劑量小於 3 倍正常劑量且未發生藥害，則試驗之施藥次數可酌減至 3 次或原施藥次數的三分之一。當擬登記使用方法的施藥期間超過 3 個月時，一般會認為最終幾次

表二、植物代謝試驗之作物及所屬作物類別⁽¹⁶⁾

Table 2. Crops and crop groups in crops metabolism studies⁽¹⁶⁾

Group	Code	Crop
Cereal/Grass crops	C/G	Cereals Grass and forage crops
Pulses and oilseeds	P/O	Legume vegetables Pulses Oilseeds Peanuts Legume fodder crops Cacao beans Coffee beans
Leafy crops	L	Brassica vegetables Leafy vegetables Stem vegetables Hops Tobacco
Root crops	R	Root and tuber vegetables Bulb vegetables
Fruits	F	Citrus fruits Pome fruits Stone fruits Small fruits Berries Grapes Banana Tree nuts Fruiting vegetables Persimmon

施藥對於殘留結果的影響較大，但試驗是否可僅採用最終幾次施藥則需依個案評估來決定。

2. 施藥劑量：若以擬登記施藥方法的最大劑量進行試驗可推測殘留量可能低於 0.01 mg/kg，為利於後續鑑定分析，可規劃以高於擬登記使用方法的劑量進行試驗，此種方式稱為超量施藥 (exaggerated rate)，但需注意不可對作物產生不良影響，尤其是作物對除草劑可能較敏感，因此提高的劑量會受到限制。

三、同位素標定位置

同位素標定位置需選擇結構穩定處以儘可能追蹤農藥有效成分於植體代謝的結構變化，通常會優先選擇 ^{14}C ，若沒有適當的碳結構可供選擇，比如碳僅存在於結構的支鏈處，亦可選用 ^{32}P 、 ^{35}S 或其他合適的同位素。放射性化學純度應高於 95%，低於 95% 應敘明理由。標定同位素強烈不建議採用氫 (^3H)，當選擇可能不穩定的支鏈或 ^3H 同位素作為標定位置，需確認是否已鑑定作物中所有顯著放射性殘留量，以及鑑定出之物質是否與農藥有效成分相關而非來自基本結構的丟失。若有效成分屬多環結構或具明顯支鏈，並預期此結構可能產生斷裂，則以兩個以上標定位置分別進行研究以反應不同環狀結構或支鏈的代謝結果。

四、採樣

應採集試驗作物所有初級農產品 (Raw Agricultural Commodity, RAC)，並對樣品的前處理方式有清楚的說明。對於可能於非成熟期食用之作物 (如玉米筍或葉用生菜等)，應以符合之食用型態進行採樣及分析，若作物同時為食用作物及飼料作物，採樣時期應包含不同的用途，另外，成熟期的非食用部位可能有助於鑑定或鑑別代謝物，如蘋果葉、馬鈴薯植株，但需與食用部位進行圖譜比對其相似性才可作為佐證。植物代謝之初級農產品分析部位引用 OECD Pesticide series No. 32 Guidance Document on overview of residue chemistry studies 的附表 4⁽¹⁷⁾ (摘錄常見的作物，表三)。

五、總放射性殘留量與萃取分析

應確保作物中放射性殘留量皆被測定，各部位之總放射性殘留量、可萃取量及無法萃取量皆需有定量數據呈現，且定量極限應達 0.01 mg/kg，報告中應呈現以 MBq/mg 表示之放射比度 (specific radioactivity)，並於試驗後換算樣品中濃度。樣品中不同殘留成分之放射性濃度應換算為「parent compound¹⁾ 當量 (parent compound equivalent)」，並同時呈現放射性殘留量 (單位為 mg/kg) 及與總放射性

¹⁾ 在農藥有效成分 (active ingredient) 之代謝試驗相關研究中，有效成分之殘留樣態包含 parent compound 及轉化產物，其中 parent compound 係指有效成分於施用後未轉化之化合物。

表三、植物代謝試驗之初級農產品分析部位
Table 3. Analyzed part of RACs in crop metabolism studies

Crop	Raw Agricultural Commodity
Apple	fruit
Asparagus	spears (stems)
Banana	whole fruit
Barley	grain, hay, straw
Bean	bean, succulent seed
Beet, sugar	root, tops (leaves)
Broccoli	flower head and stem
Brussels sprouts	leaf sprouts
Cabbage	fresh, w/wrapper leaves
Carrot	root
Cauliflower	flower head, stem
Celery	untrimmed leaf stalk (petiole)
Citrus	fruit, whole
Coconut	coconut (meat and liquid combined)
Corn, sweet	sweet corn, (K+CWHR), forage, stover
Cotton	undelinted seed, cotton gin by-products
Cucumber	fruit
Eggplant	fruit
Grape	fruit
Hops	hops cones, dried
Lettuce, head	fresh, w/wrapper leaves
Lettuce, leaf	leaves
Mung bean	bean, bean sprouts
Mushroom	cap and stem
Mustard greens	greens (leaves)
Nuts	nutmeat
Onion, bulb	bulb
Onion, green	whole plant, w/o roots
Pea	pea, succulent seed
Pea, field	seed, vines, hay
Peach	fruit
Peanut	nutmeat, hay
Radish	root, tops (leaves)
Rape	seed, forage
Rape greens	greens (leaves)
Rice	grain, straw
Sorghum, grain	grain, forage, stover
Soybean	seed, forage, hay
Spinach	leaves
Sugarcane	cane
Tea	plucked leaves
Tomato	fruit
Turnip	root, tops (leaves)
Wheat	grain, forage, hay, straw

殘留量之相對比例 (單位為 % TRR)。當作物部位之總放射性殘留量低於 0.01 mg/kg 時，由於殘留量太低難以進行後續的殘留組成鑑定，因此無需萃取，通常試驗會以超量施藥釐清該部位可能的殘留組成。樣品於處理前可先進行表面沖洗以評估藥劑的滲透情形，皮不可食類果實應分別呈現果皮及果肉之放射性殘留量，作物採樣後經切碎及均質後以溶劑萃取，可依序採用不同溶劑或不同比例的混合溶劑，萃取過程亦可結合超臨界流體萃取 (supercritical fluid extraction, SFE)、微波萃取或加速溶劑萃取 (accelerated solvent extraction, ASE) 等較新的萃取技術及分析方法，可被溶劑萃取出之放射性殘留量稱為可萃取量 (extractable residue)，溶劑無法萃取的部分則稱無法萃取量 (unextracted residue)，後者可經進一步處理再釋出部分殘留量。

六、鑑定及鑑別殘留組成

當作物部位之總放射性殘留量高於 0.01 mg/kg 時，需進一步辨別可萃取量或無法萃取量中所含的殘留組成，即瞭解殘留量中包含哪些化合物，視各部位殘留量之多寡或與總放射性殘留量之相對比例，來決定需進行「鑑定 (identify)」或「鑑別 (characterize)」的程度 (表四)，惟需注意當試驗規劃為超量施藥時，並不適合採用殘留量作為觸發值 (trigger value)。「鑑定」與「鑑別」的差異為

對化合物的辨識程度。「鑑定」為化合物之結構已被確認；「鑑別」則未確定結構，但可描述化合物的部分特性（如極性、溶解度、酸鹼值及官能基等），鑑別的程度愈高，愈能推測化合物的結構。一般期望鑑定或鑑別出之總放射性殘留量的相對比例能至少達 90% 以上，但實際進行試驗時會受限於許多因素無法達到這個目標而需要個案評估，無法達成的原因可能包含：(1) 測得的總放射性殘留量極低；(2) 放射性殘留量與生物分子鍵結；(3) 農藥有效成分代謝為許多微量的化合物。即使如此，若非殘留量極低導致鑑定困難，只要其殘留量的相對比例占有一定的量（一般認為大於 10% TRR 以上），仍應盡可能鑑別其特性。

當分離出化合物之殘留量高於 0.05 mg/kg 或 10% TRR 時，一般認為此成分為主要殘留成分 (major components)²⁾，因此應盡可能確認其結構，倘若其為數種化合物的集合，則應確認個別化合物的含量是否超過觸發值，低於 0.01 mg/kg 時通常無需鑑定或鑑別，其他是否鑑定或鑑別之策略可參考 (表四)，但這些觸發值並非絕對標準。鑑定結構需兩套互相獨立的系統去驗證，成本高，若大部分化合物已鑑定結構，可能也不需針對含量少的再去鑑定或鑑別，除了殘留量及與總放射性殘留量的相對比例，還需綜合考量總放射性殘留量中已鑑定的殘留量、總放射性殘留

量中已鑑別部分特性的殘留量、多種微量的代謝物可能無法完全鑑定但其殘留量可以共同官能基的方式進行分析、該作物部位是否會作為食物或動物飼料，以及結構相似的化合物之毒理特性等。

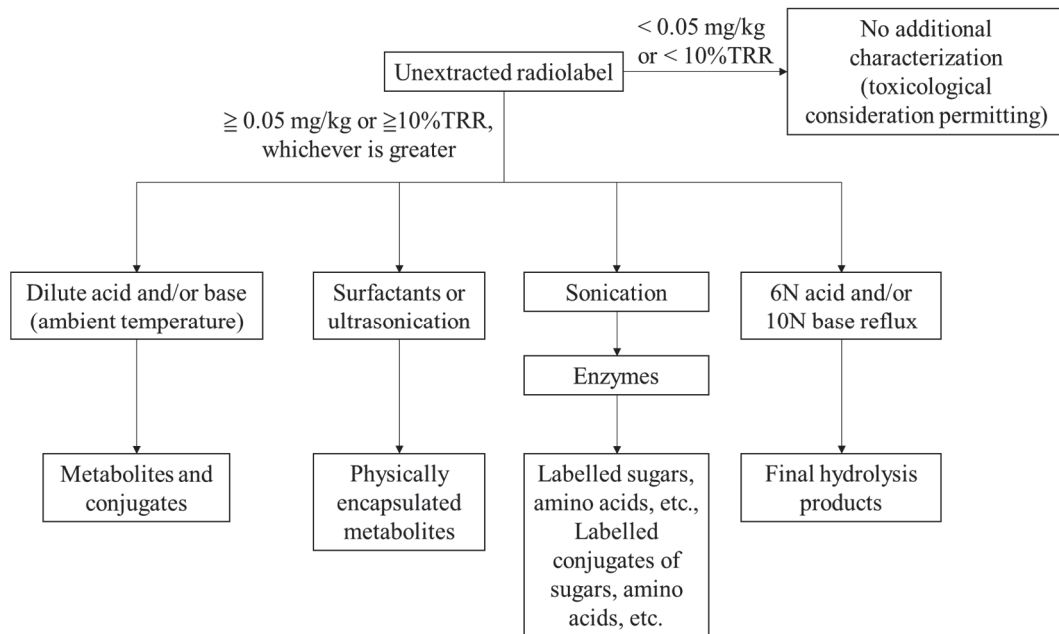
七、無法萃取量的處理

當無法萃取量高於 0.05 mg/kg 或 10% TRR 時需進一步鑑定或鑑別其中組成 (圖一)，無法被溶劑萃取的放射性殘留量形成原因可能有三種：(1) 農藥已降解為小分子碳並成為植體利用的碳源，例如形成胺基酸或醣類；(2) 與植體中如木質素或纖維素等基團經化學反應結合，可藉由酵素或酸鹼水解釋出；(3) 被作物包覆或結合，可用界面活性劑或強鹼釋出。依不同形成原因可採用不同的處理策略，常見的處理方式包含稀酸／稀鹼、界面活性劑、酵素或搭配強酸強鹼進行回流，為了得到最接近實際植體的代謝物，會優先採用較溫和的方式處理，愈強烈的處理則可能僅是釋出最終水解產物，例如搭配強酸強鹼進行回流可能促使作物基質溶解，測得的成分可能無法代表實際植體代謝產生的化合物，但可用於推論農藥已降解或與植體結合的相關資訊。試驗設計可採用適當的步驟搭配不同流程或不同處理逐步釋出無法萃取量，釋出至低於 0.05 mg/kg 或 10% TRR 即可停止，高於則依表四的觸發值進行鑑定或鑑別，但若測得產物為胺

²⁾ 主要殘留成分 (major components) 為占有顯著殘留量的成分，可能為 parent compound 或代謝物。

表四、植物代謝中可萃取殘留量之鑑定與鑑別策略⁽¹⁶⁾**Table 4.** Strategy for identification and characterization of extractable residues in crop metabolism studies⁽¹⁶⁾

Relative amount (%TRR)	Concentration (mg/kg)	Required Action
< 10	< 0.01	No action if no toxicological concern.
< 10	0.01~0.05	Characterize. Only attempt to confirm identity if straightforward, e.g., a reference compound is available or the identification is known from a previous study.
< 10	> 0.05	Characterization/identification needs to be decided on a case-by-case basis taking into account how much has been identified.
> 10	< 0.01	Characterize. Only attempt to confirm identity if straightforward, e.g., a reference compound is available or the identification is known from a previous study.
> 10	0.01~0.05	Significant attempts to identify should be made especially if needed to establish a pathway, ultimately characterization might be accepted.
> 10	> 0.05	Identify using all possible means.

圖一、無法萃取量之鑑定與鑑別⁽¹⁶⁾。**Fig. 1.** Identification and characterization of unextracted residue⁽¹⁶⁾.

基酸、醣類、酚類或核酸等，代表已代謝為作物植體碳源的小分子碳，可不需逐一鑑定其中的個別化合物。

八、儲存穩定性評估

為確保樣品於採樣後、樣品處理過程及保存期間的完整性，樣品應保存於 -18°C 以下，並應呈現儲存期間樣品的基本圖譜未改變的佐證資料，由於在試驗結束前不會知道施藥處理組樣品中存在哪些化合物，因此無法以對照樣品添加的方式進行儲存穩定性試驗，通常會以施藥處理組樣品保存的樣態來做評估，舉例來說，若樣品是以均質液保存，則需分析樣品均質液於儲存前後的變化。一般來說，6 個月內完成分析可不需進行儲存試驗評估。若儲存期間樣品的分析圖譜有變化，則可能需進行額外的分析或是進行其他採樣至分析間隔較短的代謝研究。

九、試驗報告內容應至少包含以下幾點⁽¹⁶⁾：

1. 農藥有效成分的基本資料，包含化學名、普通名、生產廠商、CAS 名稱、CAS no 及 IUPAC 化學名等。
2. 放射性標定試驗物質之相關說明，包含選用該標定位置的理由、放射性純度、性質、放射性比度、來源，若有顯著不純物應進行鑑定。
3. 試驗中使用到的參考物質（標準品）的

名稱、化學結構及純度。

4. 試驗環境的相關說明（如露天、溫室或生長箱），包含試驗期間的環境條件及土壤性質等。
5. 試驗作物的相關說明，包含品種／變種及作物所屬類別。
6. 施藥參數的詳細說明，包含施藥方式、劑型、施藥劑量、施藥次數及施藥時期（含作物生長階段）及採樣間期。
7. 採樣的相關說明，包含採樣方法、作物採收時的生長期及作物大小、採樣部位及其處理、運送和儲存方法。
8. 測定總放射性殘留量的樣品前處理及分析方法說明。
9. 對所有作物基質的萃取及分提（fractionation）的詳細說明，包含對每個分提樣品的總放射性定量數據（以 Bq 或 dpm 表示），並同時呈現濃度（以有效成分當量表示）及百分比。
10. 使用儀器、設備及試劑之完整說明，包含進行分離、鑑定或鑑別放射性殘留量之操作條件。
11. 放射性殘留量的鑑定及鑑別說明，包含所有主要殘留成分的數據，無論游離態／結合態、無法萃取放射性或天然組成的一部分，並需呈現於農產品中的殘留濃度及與總放射性殘留量的相對比例。
12. 從農產品萃取出的 parent compound 及代謝物，與參考物質比對之層析條件。
13. 總殘留量中所有主要殘留成分之儲存

穩定性資訊。

14. 經由萃取方法所得放射性殘留量回收率之定量相關資訊。
15. 詳細的綜合討論，需包含有效成分於植物體代謝之降解途徑或代謝作用。
16. 結論需包含：(1) 作物採收時或成熟期的代謝途徑；(2) 採收時於各部位的總放射性殘留量分布；(3) 對植物代謝樣品進行方法驗證，以確認日後若作為執法之分析方法之可行性，或試驗中鑑定／鑑別化合物的程度是否足以供殘留定義評估參考。

植物代謝研究要求之國際概況

我國現行農藥登記依循《農藥理化性及毒理試驗準則》⁽³⁾，有關植物代謝試驗之規定參照 OECD 試驗準則，目前國際上植物代謝研究資料要求依各國法規修訂，大多與 OECD 試驗準則調和，以下概述日本、中國、美國及歐盟的情形：

一、日本

2019 年農藥登記法規⁽⁴⁾有關植物代謝的試驗要求為依據 OECD 編號 TG501 植物代謝試驗準則，惟特別說明登記使用於水稻時應執行水稻之試驗，而作為穀倉燻蒸劑使用之農藥若已知可能為無機物或揮發性物質則可免繳交試驗。根據較早期的資料顯示，於 2014 年農林水產省 Data requirements for supporting registration of

agricultural chemicals⁽¹²⁾ 對於資料要件明列更精細的要求，如作物類別數較多 (包含水稻、穀類、甘蔗、果實類 (不含柑桔類及果菜類)、柑桔類、果菜類 (含葫蘆科作物)、花或葉可食作物、根莖可食作物、乾豆油籽類、蘑菇類、茶樹)，或是申請作物若與執行試驗作物不同時即使同類別仍可能要繳交 2 種以上的作物，但現行法規已刪除這些內容。

二、中國

於 2016 年提出植體代謝試驗準則草案⁽¹⁾，2017 年修正後正式施行⁽²⁾，試驗準則內容包含了執行試驗的基本原則、方法和要求，並需符合國家對於放射性同位素實驗許可資格的相關法規，植物代謝的作物類別與 OECD 試驗準則完全相同。由於在試驗準則已有詳細的規範，中國的農藥登記法規對於繳交植物代謝試驗資料僅有 2 點說明：

1. 從根莖類、葉類、果實類、油料類、穀類等 5 類作物中各選至少 1 種作物進行代謝試驗，如數據表明該農藥在 3 類作物中代謝途徑一致，則不需進行其他代謝試驗，否則應提交所有 5 類作物以上代謝試驗資料；
2. 如農藥僅能在某類作物上使用，則需說明原因並提交該類作物之代謝試驗資料 (具體要求見《農作物中農藥代謝試驗準則》)。

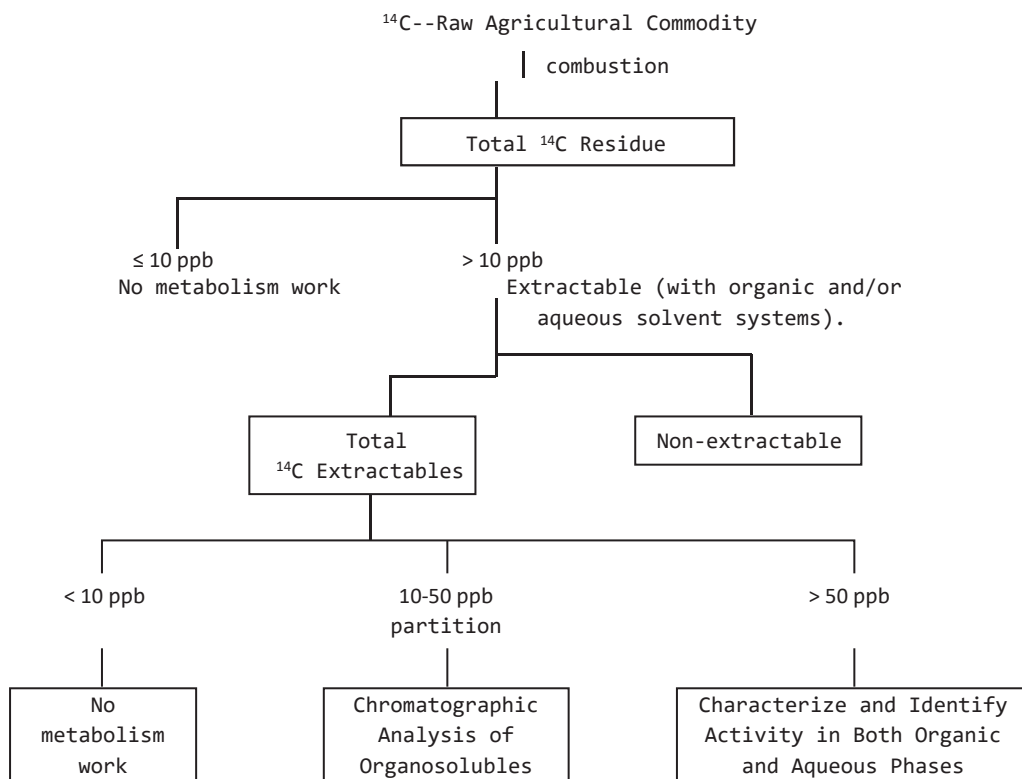
三、美國

試驗指引為 1996 年建立之植物及動物殘留分布試驗準則⁽²⁰⁾，在植物代謝的部分，試驗指引內容與 OECD 編號 TG501 植物代謝試驗準則相似，施藥劑量基本上需與擬登記使用方法相似，並依總殘留量及可萃取量進行鑑定及鑑別（圖二、圖三），為利於後續鑑定，最高可進行 10 倍劑量試驗，但亦需考量作物對除

草劑的敏感性。試驗作物應依申請作物之作物類別分別提交，作物類別引用美國法規 CFR 40 180.34 (f)，惟目前法規 CFR 40 180.34⁽²¹⁾ 已無 (f) 項目。

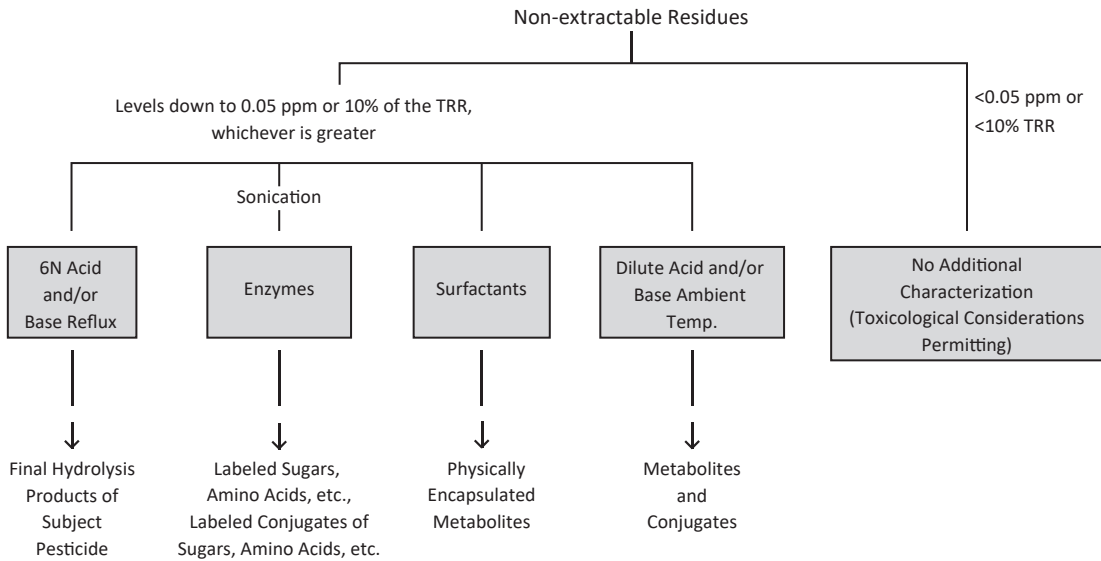
四、歐盟

試驗文件說明為 1995 年建立，1997 年修正公布⁽⁹⁾，提供概略性的指引說明，概念上亦著重在探討以與擬登記使用方法



圖二、美國植物代謝可萃取殘留量之鑑定與鑑別策略⁽²⁰⁾。

Fig. 2. Strategy for identification and characterization of extractable residues in crop metabolism in the USA⁽²⁰⁾.



圖三、美國無法萃取量之鑑定與鑑別 (20)。

Fig. 3. Identification and characterization of unextractable residue in the USA (20).

相似之劑量施藥下所產生的代謝結果，試驗標定位置通常傾向採用芳香族或環狀化合物，亦可採用兩種以上的標定位置來進行，試驗需可反應適當的用途，只要是可作為食品或飼料用途皆應採樣分析。針對不同類型的試驗也提供簡要的說明，如完整植株的試驗（包含露天、溫室、生長箱或實驗室）、特定植物部位、細胞培養等。在作物的要求上同樣是 5 種作物類別（表五）中 3 種類別之代謝途徑相似即可皆接受。當總放射性殘留量於食品小於 0.01 mg/kg 或於動物飼料小於 0.05 mg/kg 時，通常不需進行鑑定或鑑別，當超過 0.05 mg/kg 或 10% TRR 時應鑑定或鑑別所有個別成分，殘留量介於 0.01~0.05 mg/kg 時則需區分脂溶性、水溶性或無法

萃取量，視情形再進一步分析，若無法萃取量低於 0.05 mg/kg 或 25% TRR，或是大部分成分已鑑定（如超過 75% TRR）時可不需進一步分析。文件中提到採用 0.05 mg/kg 或 10% TRR 作為觸發值僅為參考指標，當產生成分有毒理疑慮或殘留量很低時可依個案考量。雖然指引為歐盟早期編寫，但基本內容與 OECD 試驗準則相似。

植物代謝資料審查之綜合考量

根據國際上植物代謝試驗準則，以下提供申請農藥登記使用時申請單位及審查人員對於植物代謝資料應注意事項，所提交之植物代謝研究報告應為 GLP (Good

表五、歐盟植物代謝試驗之作物及所屬作物類別

Table 5. Crop groupings in plant metabolism studies in the EU

Group	Crop
Cereals	Cereals
	Grass and forage crops
Pulses and oilseeds	Legume vegetables
	Pulses
	Oilseeds
Leafy crops	<i>Brassica</i> vegetables
	Leafy vegetables and fresh herbs
	Stem vegetables
	Tea
	Hops
	Tobacco
Root crops	Root and tuber vegetables
	Bulb vegetables
	Potatoes
Fruits	Citrus fruits
	Tree nuts
	Pome fruits
	Stone fruits
	Berries and small fruits
	Fruiting vegetables
	Fungi
	Miscellaneous fruit

Laboratory Practice) 報告，原則上需至少繳交 3 種類別以上的作物試驗報告，經審查其代謝途徑結果相似則不需繳交其他類別，反之則需補充；若該農藥僅申請登記於特定作物，需注意所提交報告的試驗作物應與欲申請的作物為相同作物類別。施藥方法需與擬登記使用方法相似，通常也會導入類似殘留試驗中 cGAP (critical Good Agricultural Practice) 的概念 (即最高施藥劑量、最短施藥間

期、最高施藥次數及採收期符合等)，若已預期在 cGAP 條件下殘留量仍低，為利於後續分析及鑑定代謝物，會以更高的劑量來進行試驗，但仍需確保植株在超量施藥時的健康狀態，尤其部分除草劑在超量施藥時可能對植株產生藥害，審查時需特別注意。

為了確實瞭解農藥有效成分的代謝變化，植物代謝試驗採用之放射性化學純度應高於 95%，且放射性標定位置應選擇結構穩定處，如酚類或環狀結構處⁽⁹⁾，若為多環結構或支鏈並預期可能產生斷裂，可進行兩個以上標定位置的代謝研究，試驗常採用同位素標定位置如 ¹⁴C、³⁵S、³²P 等，其中以選用 ¹⁴C 最常見，由於氫容易於植體中交換故不建議採用 ³H。採樣部位應涵蓋食用部位或飼料用途部位，各部位之總放射性殘留量、可萃取量及無法萃取量皆需有定量數據呈現，且定量極限應達 0.01 mg/kg，呈現方式應包含殘留量及與總放射性殘留量之相對比例，倘無法萃取量超過 10% TRR 或 0.05 mg/kg 時，應注意報告中是否有進一步處理及說明，依照各部位測得化合物的殘留量或相對比例進行適當的鑑定或鑑別，一般期望採收期樣品中至少有 90% TRR 能夠被鑑定或鑑別部分特性，但實際上受限於農產品中殘留量低或代謝物與植體鍵結等因素而不易達成，此外，需注意若該試驗為超量施藥，則主要參考依據以相對比例為主，不適合以殘留量作為鑑定或鑑別的判定標準。

結論與建議

植物代謝研究是為了探討農藥以擬登記使用方法施用後於植物體各部位的殘留分布、殘留組成及代謝途徑，因此符合施用方式為植物代謝試驗的基本原則，並應盡可能確認作物各部位中殘留組成，OECD 編號 TG501 植物代謝試驗準則對於作物類別、同位素標定、施藥參數、試驗設施、採樣部位、鑑定與鑑別的標準、儲存穩定性評估等均有清楚的規範，國際上現有準則或近期修訂的準則大多與 OECD 試驗準則相似，依不同國家需求制定相應的準則，聯合國糧食及農業組織 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) 於 2016 年最新修訂編號 225 之農藥殘留評估及資料要件⁽⁸⁾中，有關植物代謝的內容亦是以 OECD 試驗準則為基礎。

植物代謝試驗資料的主要用途為瞭解農藥的殘留分布及進行毒理學評估，為制定作物中殘留定義最主要的科學佐證資料^(5, 18)。當植體產生的代謝物並非動物代謝物時，毒理學上認為可能無法涵蓋其動物毒性，通常需要額外的毒理試驗來評估代謝物的毒性。萃取過程及作物中殘留組成的確認亦可作為分析方法開發及決定分析成分之基礎。此外，若產生的代謝物經確認為其他已登記農藥或其代謝物或轉化產物時，主管機關於風險評估過程應列入考量。

植物代謝研究的審查為標準制定的基礎，我國目前參照 OECD 試驗準則進行

資料提交及相關審查，有關資料提交需依所申請作物繳交對應作物類別之植物代謝資料，欲推估至所有作物範圍應至少繳交 3 種作物類別，非法規所列作物應額外提交植物代謝試驗，若需以此作物作為提交 3 類別之一時，建議先向主管機關諮詢。另外，水稻為我國重要農作物，參照 OECD 試驗準則並考量水稻與其他穀類作物之生長條件不同，且日本現行規範亦規定水稻應獨立進行試驗，建議農藥在我國擬登記於水稻害物防治時應繳交水稻之植物代謝試驗資料。未來可借鏡其他先進國家，對於法規有更清楚的說明並滾動式修訂，有利申請單位提交備審資料，提升審查的透明度。

謝辭

感謝衛生福利部食品藥物管理署補助本研究計畫 MOHW110-FDA-F-113-000312，謹此致謝。

引用文獻

1. 中华人民共和国农业部。2016。植物中农药代谢试验准则 (征求意见稿)。檢自 <http://www.chinapesticide.org.cn/u/cms/www/201610/28165039u4z5.pdf> (Sep. 28, 2020)
2. 中华人民共和国农业部。2017。农作物中农药代谢试验准则。中华人民共和国农业部标准 NT/T 3096-2017。10 頁。

3. 行政院農業委員會。2018。農藥理化性及毒理試驗準則。農防字第 1071488885 號令修正發布第 3 條附件二。
4. 農林水産省。2019。農薬の登録申請において提出すべき資料について。檢自 https://www.acis.famic.go.jp/shinsei/6278/6278_2nd.pdf (Mar. 27, 2021)
5. 蒲玠涵、徐慈鴻、費雯綺 譯。2015。殘留定義評估指引 (2009 年修訂)。OECD 授權，行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所印行。OECD 環境、健康及安全刊物系列，農藥專輯第 31 篇。臺中市。54 頁。
6. Hamilton, D., Yoshida, M., Wolterink, G., and Solecki, R. 2017. Chapter 4: Evaluation of pesticide residues by FAO/WHO JMPR, pp.113-196. *In*: Á. Ambrus & D. Hamilton [eds.], Food safety assessment of pesticide residues. World Scientific Publishing Europe Ltd., London. 568 pp.
7. Devlin, R. M. 1967. Plant Physiology, Reinhold, New York. 564 pp.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2016. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed, 3rd edition. Plant production and protection paper No. 225. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 298 pp.
9. Commission of the European Communi- ties. 1997. Appendix A: Metabolism and distribution in plants. Document number 7028/VI/95 rev. 3, 22/7/97, Directorate General for Agriculture VI B II-1.
10. Hull, H. M. 1970. Leaf structure as related to absorption of pesticides and other compounds. *Residue Rev.* 31: 1-150.
11. Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M. and Hall, J. C. 2000. Pesticide metabolism in plants and microorganism: An overview, pp 2-27. *In*: J. C. Hall, R. E. Hoagland, and R. M. Zablotowicz [eds.], Pesticide biotransformation in plants and microorganisms. American Chemical Society, Washington, DC. 448 pp.
12. Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries of Japan (MAFF). 2014. Data Requirements for Supporting Registration of Agricultural Chemicals. Document number 26-Shoan-533, partly revised on May 15, 2014.
13. Menn, J. J., and Still, G. G. 1977. Metabolism of insecticides and herbicides in higher plants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 5: 1-21.
14. Menn, J. J. 1978. Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals. *Environ. Health Perspect.* 27: 113-124.
15. Norris, L. A. 1974. Behavior of pesticides in plants. USDA forest service general technical report PNW-19.
16. Organization for Economic Cooperation

- and Development (OECD). 2007. Test No. 501: Metabolism in crops, OECD guideline for the testing chemicals, OECD, Paris, France. 20 pp.
17. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2009. Guidance document on overview of residue chemistry studies, OECD series on testing and assessment No. 64 and series on pesticides No. 32, OECD, Paris, France. 93 pp.
 18. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2009. Guidance document on the definition of residue, OECD series on Testing and Assessment No 63 and Series on Pesticides No 31, Paris, France. 38 pp.
 19. Singh, A., Prasad, S. M., and Singh, R. P. 2016. Plant responses to xenobiotics. Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore. 362 pp.
 20. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Residue chemistry test guidelines: OPPTS 860.1300, Nature of the residue-plants, livestock. Document number EPA 712-C-96-172.
 21. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2008. Federal regulation title 40 part 180 §180.34 Tests on the amount of residue remaining. Retrieved from <https://ecfr.federalregister.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180/subpart-B/section-180.34> (Mar. 27, 2021)
 22. Van Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowicz, R. M., and Hall, J. C. 2003. Pesticide metabolism in plant and microorganisms. *Weed Sci.* 51: 472-495.

Introduction to Data Requirements from Plant Metabolism Studies for Pesticide Registration

Hui-Yuan Cheng¹, Shu-Han Yang¹, Mei-Hui Cheng¹, Tsy-Horng Shyu^{1*}

Abstract

Cheng, H. Y., Yang, S. H., Cheng, M. H., and Shyu, T. H. 2021. Introduction to data requirements from plant metabolism studies for pesticide registration. *Taiwan Pestic. Sci.* 10: 29-47.

Plant metabolism studies are required for pesticide registration in order to (1) determine the distribution of residues, (2) identify components of the terminal residue, and (3) elucidate the metabolic pathways when a pesticide is applied to crops with the proposed Good Agricultural Practice (GAP). Currently, there are no guidelines for plant metabolism studies in Taiwan. The relevant regulation in Agro-pesticides Management Act stated that the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines can be consulted. According to the OECD guideline for the testing of chemicals No. 501 “Metabolism in crops”, the objective of plant metabolism studies is to identify and characterize the entire Total Radioactive Residue (TRR); however, this may not be possible in many cases. The OECD guideline also include requirements for crops, crop groups, isotopic labeling of active ingredients, application parameters, test facilities, sampling of crop parts, identification and characterization of residues, treatment of unextractable amounts, and storage stability. In recent years, some countries, such as China and Japan, have revised their test guidelines of plant metabolism with harmonizing the OECD guidelines. Plant metabolism studies are among the most important scientific supporting materials to assess the residue definition in crops. They are also the reference

Accepted: August 9, 2021.

* Corresponding author, E-mail: ths@tactri.gov.tw

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

for determining the analysts of the enforcement analytical methods. Furthermore, identifying plant metabolites that are not animal metabolites is also an important task to evaluate the toxicity. This article presents concepts pertaining to plant metabolism and related requirements described in OECD test guidelines in order to improve understanding of the plant metabolism studies that are required for pesticide registration. The article should be useful to both applicants and reviewers. We also provide some suggestions for the pesticide registration authority as a reference to improve the relevant regulations in the future.

Key words: plant metabolism, pesticide registration, residue definition, residue distribution, total radioactive residue