

# 四氯異苯腈、菲克利與益達胺三種農藥之多重混合毒性評估

楊俊宏<sup>1\*</sup> 林天宇<sup>1</sup> 蔡建任<sup>1</sup>

## 摘要

楊俊宏、林天宇、蔡建任。2016。四氯異苯腈、菲克利與益達胺三種農藥之多重混合毒性評估。臺灣農藥科學 1: 1-23。

農藥是保護植物、提高農產品產量與發展農業必需的資材，但也面臨著混合多種農藥施用後超量殘留於蔬果的食入風險。而考量這些具高殘留暴露風險農藥間之不同藥物混合暴露是否可能產生藥物混合交互作用，導致對人類之毒性增加，是評估農藥多重殘留風險最重要的課題。先前研究顯示菲克利、四氯異苯腈與益達胺農藥分別具引起肝、腎與神經毒性之潛在風險。因此，本研究擬驗證探討菲克利、四氯異苯腈與益達胺等 3 種不同毒性作用機制農藥混合投予大鼠 28 天餵食亞急性毒性後，對肝、腎或神經毒性可能產生之多重毒性作用。結果顯示，單一處理菲克利 150 mg/kg/day (約為 ADI 值 0.0047 mg/kg/day 之 30,000 倍)、四氯異苯腈 200 mg/kg/day (約為 ADI 值 0.03 mg/kg/day 之 6,700 倍) 或益達胺農藥 75 mg/kg/day (約為 ADI 值 0.057 mg/kg/day 之 1,250 倍)，分別特異性的產生肝脂肪變性 (fatty change in the liver)、ALT 下降與出現顫抖神經症狀之神經毒性表現，而經分別兩兩混合或混合 3 種上述農藥之試驗組對於單一農藥所表現出之特異性毒性表現均不會明顯加重其毒性表現，顯示 3 種農藥混合不具劑量相加混合效應，更不具毒性加乘協力作用；而只具同時表現其單一農藥產生之特異性毒性表現。可作為多種農藥殘留之食用風險性安全性參考。

**關鍵詞：**交互作用、協力效應、混合物、劑量相加、累積性風險評估、拮抗作用。

---

接受日期：2016 年 9 月 10 日

\* 通訊作者。Email: yjh@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農藥藥物毒物試驗所

## 緒言

農藥是保護植物、提高農產品產量與發展農業必需的資材，但也面臨著混合多種農藥施用後超量殘留於蔬果食入風險的安全性議題。由於農藥對人體的殘留風險，通常只針對單一農藥進行完整毒理安全評估，但農民於田間進行植物病害防治時，基於噴灑農藥之習慣、防治對象之不同、混合農藥劑型之使用或避免農藥抗藥性之產生往往混合使用不同類農藥，如殺菌劑或殺蟲劑。此時若農民疏忽各農藥之安全採收期，則不同農藥即可能混合殘留於蔬果或食用作物中，因此人們食用不同農作物時自然會同時接觸到許多種不同的農藥，而這些混用之農藥又可能與環衛用藥、食物中特定成分甚至是治療藥物同時暴露。而考量這些具高殘留暴露風險農藥間之不同藥物混合暴露是否可能產生藥物混合交互作用，導致對人類之毒性增加，是評估農藥多重殘留風險最重要的課題。

目前國際上對於多重農藥混合毒性之評估，主要依據其對哺乳動物毒性作用機制 (toxicity mode of action) 區分為以下幾種混合毒性樣態<sup>(9, 12, 16)</sup>，首先當農藥間不存在交互作用 (no interaction) 且當多重農藥作用於相同之毒性作用機制時，即具有劑量相加效應 (dose additivity)，亦即透過相同之毒性機制作用於哺乳動物相同之生物反應位置 (biological site)，差異只在於不同農藥引起毒性之嚴重程度之潛能 (potency)，多重農藥之毒性為個別農藥毒性相加之結果，

適用於農藥之累積性風險評估 (accumulation risk assessment)；另一方面當多重農藥作用於完全不同之毒性作用機制時，且毒性作用完全不相關時，多重農藥之毒性為個別農藥毒性反應表現之結果 (response additivity)。其次當農藥間存在交互作用 (interaction) 時，農藥間具交互作用可定義為農藥混合後，相較於前述不存在交互作用之相加作用，將導致更嚴重之加乘協力反應 (synergism) 或更輕微之拮抗作用 (antagonism)。

其中多重農藥針對累積風險即劑量相加效應，目前研究較為透徹，如美國環保署 (U.S. EPA) 已針對相同毒性作用機制農藥如有機磷 (organophosphate) 及氨基甲酸鹽 (carbamate) 等 5 類農藥均已完成其風險評估<sup>(14, 15)</sup>。然而對於毒性作用機制不相同之多重農藥風險，因不同毒性作用機制間，是否存在交互作用，而留下評估多重農藥風險時之不確定度。進行一個完整的多重殘留毒理試驗，將需要  $2^N - 1$  個試驗組<sup>(2)</sup>，來釐清所有可能的多重農藥之間的混合毒性作用 (N 是多重農藥混合物中不同農藥之數目)，而要實際去測試各種多重農藥混合物組合之毒性往往是困難且不可行。因此，為探討毒性作用機制不相同農藥之多重混合毒性，將透過國際上目前之研究趨勢以及我們針對 3 種農藥採取驗證策略的研究模式，所得到的初步結果，做為進一步說明毒性作用機制不相同多重農藥殘留於蔬果的風險。進而依蒐集相關國際資料及考量國內高使用量、高殘留及農藥毒性作用

機制不相同之農藥，選擇驗證農藥標的為菲克利及四氯異苯腈殺菌劑與益達胺殺蟲劑等 3 種農藥。

益達胺、四氯異苯腈與菲克利 3 種農藥可透過不同毒性作用機制，對動物引起不同之毒性表現。其中益達胺屬新尼古丁類系統性殺蟲劑，具昆蟲接觸毒及胃毒作用，殺蟲作用為乙醯膽鹼酯受體的作用體而影響神經系統，主要防治對象為 8,000 倍稀釋用於小葉菜類蚜蟲；而對哺乳動物毒性中，大鼠口服急毒性 LD<sub>50</sub> 約為 424 mg/kg BW，兩年大鼠慢毒性 NOAEL 值為 5.7 mg/kg/day，ADI 值訂為 0.057 mg/kg/day，於短期試驗中對哺乳動物可透過抑制乙醯膽鹼酯酶 (acetylcholinesterase) 而出現顫抖等神經毒性<sup>(6)</sup>；四氯異苯腈殺菌劑，其殺菌作用機制為和真菌細胞內分子上的 -NH 及 -SH 根結合，使真菌細胞內的硫醇基 (thiol group) 不活化，導致醣解作用 (glycolysis) 而降低真菌的生長速率及孢子發芽，主要防治對象為 700 倍稀釋用於小葉菜類葉斑病；而對哺乳動物毒性中，大鼠口服急毒性 LD<sub>50</sub> 約為 > 10,000 mg/kg BW，一年狗長期毒性 NOAEL 值為 3 mg/kg/day，ADI 值訂為 0.03 mg/kg/day，長期試驗中會產生腎小管增生 (hyperplasia) 之腎毒性<sup>(20)</sup>，在短期試驗中會導致血清中丙氨酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT) 下降現象<sup>(19)</sup>。而菲克利殺菌劑，其殺菌作用機制為抑制其麥角醇的合成，而麥角醇合成是子囊菌及擔子菌特有的代謝循環，主要防治對象為 1,500 倍稀釋用於水稻紋枯病及韭菜銹病；而對哺乳動

物毒性中，大鼠口服急毒性 LD<sub>50</sub> 約為 2,189 mg/kg BW，兩年大鼠慢毒性 NOAEL 值為 0.47 mg/kg/day，ADI 值訂為 0.0047 mg/kg/day，因抑制動物體內細胞色素 P450 單加氧酶 (monooxygenase)，進而抑制類固醇和脂肪酸的羥化反應 (hydroxylation)，引起脂肪代謝異常而導致肝細胞脂肪堆積而引起肝毒性<sup>(13)</sup>。因此，本研究擬驗證探討菲克利、四氯異苯腈與益達胺殺等 3 種不同毒性作用機制農藥混合投予動物後，對肝、腎或神經毒性可能產生之多重毒性作用。驗證方法受限於 2 年慢毒試驗期間太長，因而採大鼠 28 天餵食亞急毒性試驗方法，其次為使驗證試驗之混合毒性易於顯現，因而試驗劑量之選擇為高劑量約高於實際農藥殘留標準之 1,000 至 30,000 倍劑量，以期對多重農藥殘留風險之交互危害有更深一層的認知。

## 材料與方法

一、試驗動物：試驗動物為 5 週齡 Wistar 品系大鼠 (Biolasco, Ilan, Taiwan)，在本所動物飼育室留置觀察 3 週後，取體重相近之健康成鼠進行試驗。試驗動物在處理前隔夜禁食外，平時給予充足之飼料 (Lab-Diet® 5001 Rodent Diet, PMI, IN, USA) 及逆滲透水。動物飼育室之進氣經由初級、中級及高效能濾網過濾空氣，溫度範圍為 19 ~ 25°C、相對濕度範圍為 40 ~ 70% 及光照週期為 12 小時光 / 12 小時暗。所有實驗動物之使用與操作均依據「實驗動物照護與使

用指南」<sup>(1)</sup>之規範進行，且經本所實驗動物照護及使用小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, TACTRI) 審查通過。

二、試驗農藥：試驗農藥為針對國內具高殘留且具神經毒性的殺蟲劑益達胺 (Imidacloprid, 95% TC, 興農股份有限公司)，混合不同作用機制但具肝腎毒性之殺菌劑四氯異苯腈 (Chlorothalonil, 98% TC, 台灣庵原農藥股份有限公司) 與具肝毒性之菲克利農藥 (Hexaconazole, 95% TC, 興農股份有限公司)。

三、試驗設計：3 種農藥以 7 種不同組合混合投藥後，以探討 3 種不同毒性作用機制農藥同時混用後對動物肝、腎與神經毒性之影響。農藥單劑劑量之推估為依據 1/3 LD<sub>50</sub>、1/5 LD<sub>50</sub> 或 1/10 LD<sub>50</sub> 值，或以人體每日可接受劑量 (acceptable daily intake, ADI) 回推或參考 90 天文獻無毒害劑量 (no observed adverse effect level, NOAEL) 回推。最後各農藥單劑劑量分別為益達胺劑量為 75 mg/kg BW，四氯異苯腈劑量為 200 mg/kg BW；菲克利劑量為 150 mg/kg BW，溶媒為玉米油 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA)；對照組只投予溶媒 10 mL/kg BW。試驗計分 8 組包括空白對照組、四氯異本腈 200 mg/kg BW、益達胺 75 mg/kg BW、菲克利 150 mg/kg BW、四氯異本腈 200 mg/kg BW 混合益達胺 75 mg/kg BW、四氯異本腈 200 mg/kg BW 混合菲克利 150 mg/kg BW、益達胺 75 mg/kg BW 混合菲克利 150 mg/kg BW 及同時混合 3 種農藥之動物投藥處理組。

四、試驗方法：每試驗組大鼠雌雄鼠

各 5 隻 (N = 10) 依其劑量每週以胃管投藥 5d 連續 4 wk (10 mL/kg BW)，進行農藥對大鼠之 28 天餵食亞急性毒性試驗，試驗準則符合美國環保署農藥安全評估準則「28 天餵食毒性」試驗規範<sup>(17)</sup>，及經濟合作與發展組織「28 天餵食毒性」試驗規範<sup>(8)</sup>。處理後每日記錄是否出現中毒症狀、症狀發生、復原及死亡時間，試驗連續觀察至處理第 28 天試驗結束為止並於每週稱大鼠體重 1 次。另於投藥 28 天後以乙醚麻醉犧牲，由後腹部大動脈收集血液，所採集血液及血清作為血液學、血清生化等分析，同時採集腦、肝、腎紀錄臟器重。

五、血清生化酵素學檢查：28 天試驗結束後，以乙醚麻醉大鼠並自腹部大動脈放血採集血清，並以血清生化分析儀 (Fuji, Tokyo, Japan) 分析血清中丙氨酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天門冬氨酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、丙麩氨轉肽酶 (gamma-glutamyl transpeptidase, GGT)、血清尿素氮 (blood urine nitrogen, BUN) 及肌酸酐 (creatinine) 等酵素。

六、組織病理評估：所有大鼠經剖檢觀察體內肉眼病理變化，並採集臟器浸泡於 10% 中性福馬林溶液中固定 1 wk，經組織粗修、脫水、透明化、石蠟浸潤及包埋等步驟處理製成組織石臘塊，再以石臘組織切片機 (Leica, Nussloch, Germany) 切成 3 μm 厚度之組織切片，以 Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色並於光學顯微鏡 (Nikon, Tokyo, Japan) 觀察組織病理變化並以影像照相機 (Nikon, Tokyo, Japan) 擷取影像。

七、肝臟油紅 (Oil Red O) 與 gamma GT

染色病理評估：所有大鼠解剖時將 5 葉肝葉均先取各 1/3 置於夾鍊袋中，並迅速丟入液態氮中固定，並置於 -80°C 冰櫃中儲存並進行冷凍切片製成 5  $\mu\text{m}$  厚度之冷凍組織切片，以 L-glutamic acid (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 試藥處理後經 gamma GT 染色法<sup>(10)</sup> 及經油紅染色法後，分別於光學顯微鏡下進行 gamma GT 陽性病灶與脂肪肝病評估。

八、血清中乙醯膽鹼酯酶分析：以商品化乙醯膽鹼酯酶酵素套組 (Sunlongbiotech, Zhejiang, China) 測試並以 Epoch® 免疫酵素分析儀 (Bioteck, Beirut, Lebanon) 於 450 nm 波長下分析定量血清中乙醯膽鹼酯酶含量。

九、肝臟 CYP1A1 & 1A2、CYP3A4、CYP2B6、CYP2C19 等蛋白質西方墨點法 (western blot analysis) 分析評估：肝臟組織進行肝細胞中蛋白質萃取，經蛋白質定量後進行蛋白質電泳並轉漬至 polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上並分別以特異性之 CYP1A1 & 1A2、CYP3A4、CYP2B6 及 CYP2C19 (Abcam, Cambridge, USA) 等單株抗體標示 CYP 等蛋白。

十、結果統計分析：各組數據以平均值及標準偏差值 (Mean  $\pm$  SD) 表示，並以 One-Way Analysis of Variance (STATISTICA, Tulsa, USA) 之 LSD 分析法，進行處理與對照組間統計分析，*P* 值小於 0.05 為具統計顯著性差異。

十一、相關組織之病變程度 (criterion) 乃依據組織病變程度量化判讀品質標準判讀<sup>(11)</sup>，標準如下：(1) 程度無，積分 (score)

為 0：無可見之組織病理變化 (no significant lesion)。(2) 程度為極少 (minimal)，積分為 1：具 < 1% 以下程度的組織病理變化。(3) 程度為輕微 (slightly)，積分為 2：具 1 ~ 25% 程度的組織病理變化。(4) 程度為中度 (moderate)，積分為 3：具 26 ~ 50% 程度的組織病理變化。(5) 程度為中度至嚴重 (moderate to severe)，積分為 4：具 51 ~ 75% 程度的組織病理變化。(6) 程度為嚴重 (severe)，積分為 5：具 76 ~ 100% 程度的組織病理變化。

## 結果

一、臨床毒性症狀與死亡率：臨床症狀上可見含益達胺農藥之各試驗組均出現顫抖 (trembling) 等神經症狀，該神經症狀約於投藥後 2 至 3 h 內出現，但隔夜後症狀即回復，該神經症狀為可逆性表現，但含益達胺農藥之各試驗組間其神經症狀表現程度上並無差異；死亡率上可見含四氯異苯腈農藥之各試驗組均出現約 20% 之死亡率，但同時混合投予 3 種農藥之致死率反而降至 10%，各試驗組動物死亡率詳如表一所示。

二、肝相對重量：雄鼠肝相對重量上顯示含菲克利之各試驗組包括混合四氯異苯腈 (0.045  $\pm$  0.004%)、混合益達胺 (0.058  $\pm$  0.007%) 及單一菲克利處理組 (0.051  $\pm$  0.009%) 與對照組 (0.034  $\pm$  0.004%) 相較均明顯增加肝相對重量 (*P* < 0.05)，但同時混合投予 3 種農藥之試驗組 (0.048  $\pm$  0.008%) 並

表一、強迫餵飼四氯異苯腈、菲克利及益達胺等 3 種農藥之單一農藥、兩兩混合與 3 種混合農藥對大鼠之 28 天餵食亞急性混合毒性評估死亡率結果

**Table 1.** Rat mortality associated with single or combined exposure to hexaconazole and difenoconazole pesticides, as determined through repeated dose 28-day oral toxicity studies

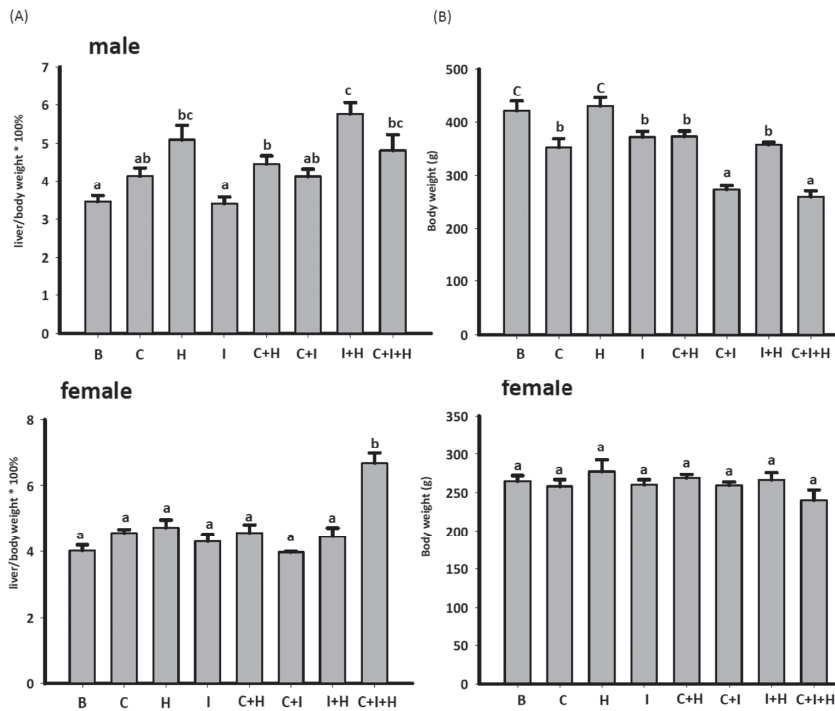
Dose level (mg/kg body weight)	Death No. / Treatment No.			Mortality (%) <sup>1)</sup>
	Male	Female	Total	
Blank Control	0/5	0/5	0/10	0
Chlorothalonil (C) 200	1/5	1/5	2/10	20
Imidacloprid (I) 75	0/5	0/5	0/10	0
Hexaconazole (H) 150	0/5	0/5	0/10	0
C 200 + I 75	0/5	2/5	2/10	20
C 200 + H 150	1/5	1/5	2/10	20
I 75 + H 150	0/5	0/5	0/10	0
C 200 + I 75 + H 150	1/5	0/5	1/10	10

<sup>1)</sup> Mortality (%) = Death No. / Treatment No. × 100%.

不會加重含菲克利各試驗組之肝相對重量 ( $P > 0.05$ )；雌鼠肝相對重量上顯示除混合 3 種農藥之試驗組 ( $0.067 \pm 0.007\%$ ) 與對照組 ( $0.040 \pm 0.005\%$ ) 相較明顯增加肝相對重量外 ( $P < 0.05$ )，其餘各試驗組間均無差異 ( $P > 0.05$ )，各試驗組動物肝平均相對重與體重資料詳如圖一所示。

三、肝血清生化毒性指標 ALT、AST 及 gamma-GT 酵素值之影響：(1) ALT 表現：無論雌雄單一處理四氯異苯腈 (雄： $18 \pm 5$  units/L；雌： $14 \pm 5$  units/L) 與對照組 (雄： $34 \pm 5$  units/L；雌： $31 \pm 10$  units/L) 相較均明顯降低 ALT 酵素表現 ( $P < 0.05$ )，顯示 ALT 酵素降低為四氯異苯腈之特異性指標，但無論雌雄同時混合含四氯異苯腈之 2 種農藥試驗組包括混合菲克利 (雄： $34 \pm 24$

units/L；雌： $15 \pm 3$  units/L)、混合益達胺 (雄： $25 \pm 7$  units/L；雌： $12 \pm 3$  units/L) 或混合 3 種農藥之試驗組 (雄： $23 \pm 11$  units/L；雌： $12 \pm 6$  units/L) 並不會加重單一四氯異苯腈試驗組 ALT 酵素降低 ( $P > 0.05$ )；(2) AST 表現：雄鼠顯示含菲克利之 2 種農藥試驗組包括混合四氯異苯腈 ( $87 \pm 20$  units/L)、混合益達胺 ( $98 \pm 17$  units/L) 各試驗組與對照組 ( $76 \pm 6$  units/L) 相較均明顯增加 AST 酵素 ( $P < 0.05$ )，但同時混合投予 3 種農藥之試驗組 ( $86 \pm 14$  units/L) 並不會加重含菲克利各試驗組之 AST 酵素增加 ( $P > 0.05$ )；雌鼠同時混合投予 3 種農藥之試驗組 ( $74 \pm 4$  units/L) 亦不會加重同時混合含菲克利之 2 種農藥試驗組包括混合四氯異苯腈 ( $90 \pm 19$  units/L)、混合益達胺 ( $65 \pm 11$  units/L) 之



圖一、試驗農藥對各試驗組動物 (A) 肝平均相對重與 (B) 體重影響結果。

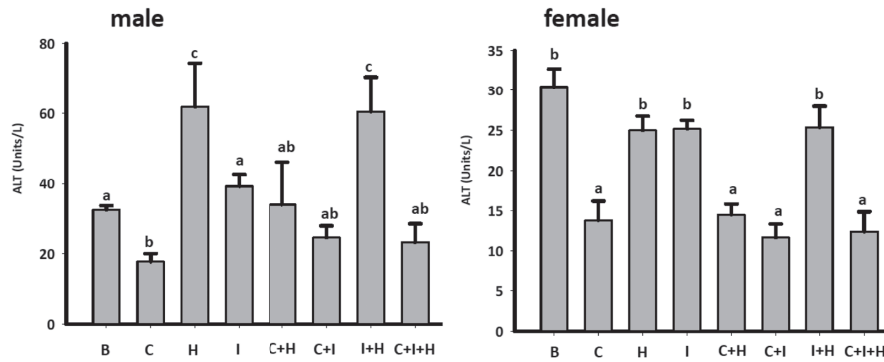
**Fig. 1.** (A) Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the ratio of rat liver/body weight; (B) Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat body weight.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different from each other at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.

AST 酵素增加 ( $P > 0.05$ )。 (3) 而於  $\gamma$ -GT 酵素表現上，雄性單一處理四氯異苯腈 ( $2.0 \pm 0.8$  mg/dL) 或菲克利 ( $2.0 \pm 0.7$  mg/dL) 與對照組 ( $1.0 \pm 0.0$  mg/dL) 相較均明顯增加  $\gamma$ -GT 酵素表現 ( $P < 0.05$ )，雖同時混合 3 種農藥之試驗組 ( $4.5 \pm 1.3$  mg/dL) 會加重單一四氯異苯腈或菲克利試驗組之  $\gamma$ -GT 酵素上升 ( $P < 0.05$ )，但同時混合 2 種農藥之各試驗組包括菲克利混合四氯異苯腈 ( $1.5 \pm 0.6$  mg/dL)、菲克利混合益

達胺 ( $1.4 \pm 0.5$  mg/dL) 與益達胺混合四氯異苯腈 ( $1.4 \pm 0.6$  mg/dL) 試驗組並不會加重單一四氯異苯腈或菲克利試驗組之  $\gamma$ -GT 酵素上升 ( $P > 0.05$ )；而雌鼠所有試驗組間對  $\gamma$ -GT 酵素表現均無差異 ( $P > 0.05$ )。各試驗組 ALT、AST 與  $\gamma$ -GT 等毒性指標酵素詳如圖二、三及四所示。

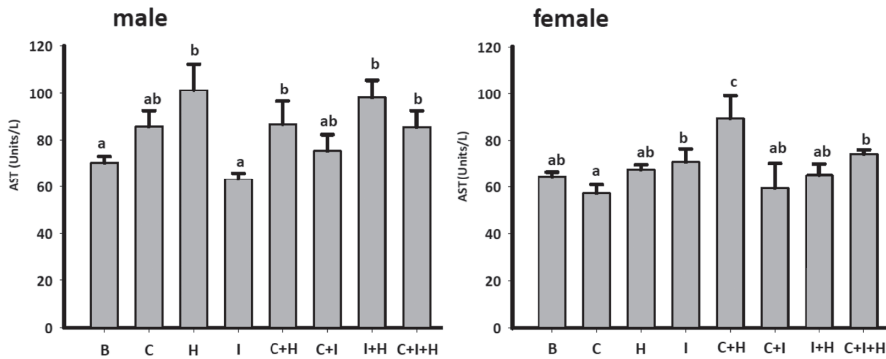
四、肝組織病理學之影響：肝組織病理學可見含菲克利農藥之各試驗組均出現肝細胞空泡化之肝脂肪變性顯微病變，病



圖二、試驗農藥對各試驗組血清中 ALT 酵素影響結果。

**Fig. 2.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum ALT levels in rats.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖三、試驗農藥對各試驗組血清中 AST 酵素影響結果。

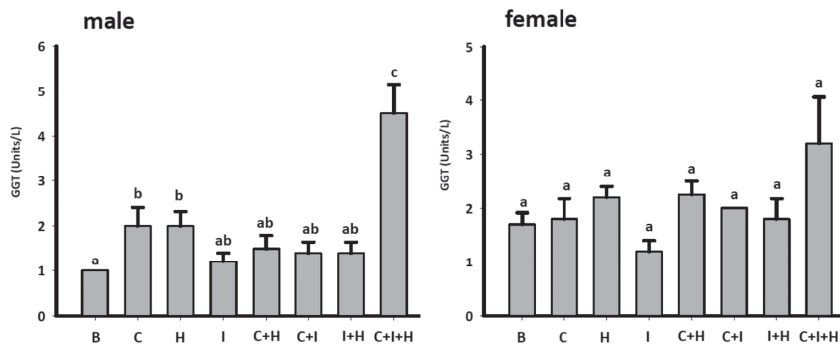
**Fig. 3.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum AST levels in rats.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.

變程度均為中度，積分為 3，約具 26 ~ 50% 程度的組織病理變化，其餘不含菲克利農藥之試驗組則無此病變，顯示該病變為菲克利農藥特異性之肝毒性表現，但含菲克利農藥之各試驗組其肝細胞空泡化脂肪變

性表現程度上並無差異，各試驗組肝組織病理病變詳如圖五所示。

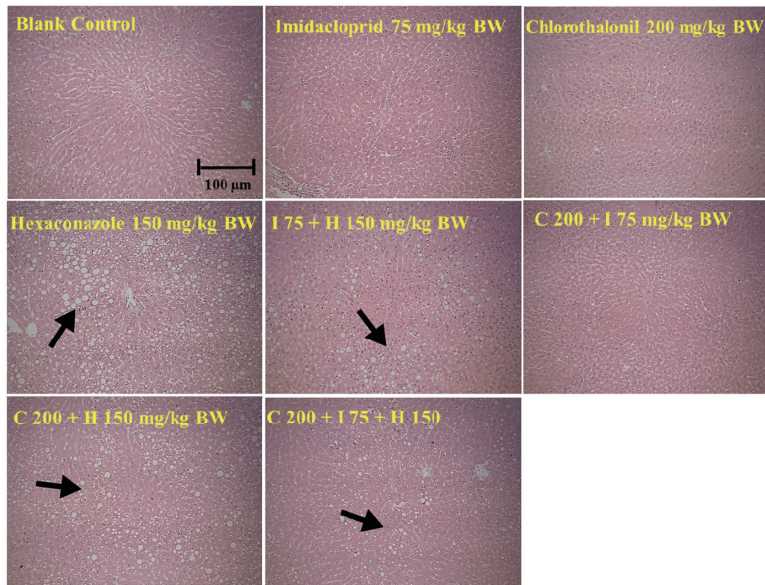
五、油紅染色結果：除含菲克利農藥之各試驗組與空白對照組相較為陽性結果外，陽性程度均為中度，積分為 3，約具 26 ~



圖四、試驗農藥對各試驗組血清中 gamma-GT 酵素影響結果。

**Fig. 4.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum gamma-GT levels in rats.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.



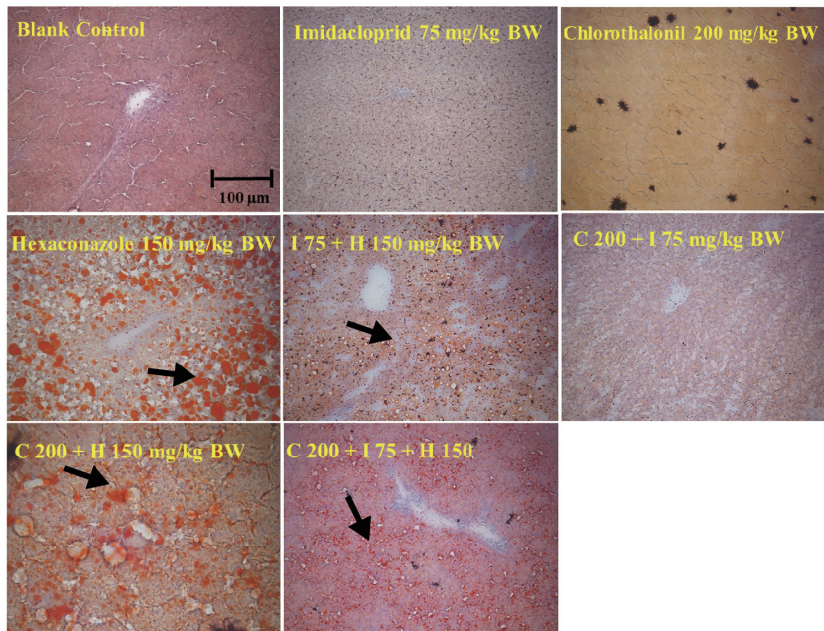
圖五、試驗農藥對各試驗組大鼠肝組織病理影響結果 (H & E; 100X)，其中 C 代表 Chlorothalonil 縮寫，H 代表 Hexaconazole 縮寫，而 I 代表 Imidacloprid 縮寫。

**Fig. 5.** Pathologic findings showing the effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat livers (H & E stain; 100X). C: Chlorothalonil, H: Hexaconazole, and I: Imidacloprid. Arrows denote the lesions of hepatocyte vacuolation (fatty changes).

50% 程度的組織陽性病變，其餘各試驗組均為陰性結果，且含菲克利農藥之各試驗組其油紅染色表現程度上並無差異，各試驗組肝組織肝油紅染色詳如圖六所示。

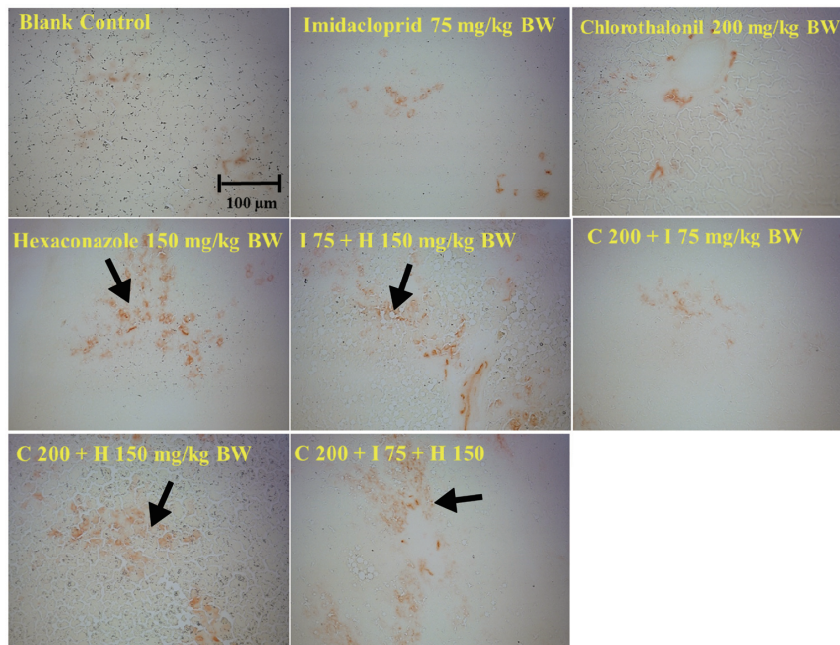
六、Gamma GT 染色結果：除含菲克利農藥之各試驗組與空白對照組相較為陽性結果外，陽性程度均為輕度，積分為 2，約具 1 ~ 25% 程度的組織陽性病變，其餘各試驗組均為陰性結果，且含菲克利農藥之各試驗組其 Gamma GT 陽性灶表現程度上並無差異，各試驗組 Gamma GT 染色組織病變詳如圖七所示。

七、腎相對重量：腎相對重量上無論雌雄均可見含四氯異苯腈農藥之各試驗組包括單一四氯異苯腈 (雄：1.00 ± 0.04%；雌：0.96 ± 0.03%) 及四氯異苯腈混合菲克利 (雄：0.83 ± 0.02%；雌：0.94 ± 0.02%)、四氯異苯腈混合益達胺 (雄：0.94 ± 0.03%；雌：1.06 ± 0.06%) 或混合 3 種農藥之試驗組 (雄：1.07 ± 0.02%；雌：1.14 ± 0.07%) 與對照組 (雄：0.74 ± 0.02%；雌：0.82 ± 0.03%) 相較明顯增加其腎相對重量 ( $P < 0.05$ )，且同時混合含四氯異苯腈 3 種農藥試驗組確實加重同時混合含四氯異苯腈之 2 種農藥試驗組與單一四



圖六、試驗農藥對各試驗組大鼠肝組織油紅染色病理影響結果 (Oil Red O; 100X)。其中 C 代表 Chlorothalonil 縮寫，H 代表 Hexaconazole 縮寫，而 I 代表 Imidacloprid 縮寫。

Fig. 6. Results of Oil Red O staining tests showing the effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat livers (Oil Red O stain; 100X). C: Chlorothalonil, H: Hexaconazole, and I: Imidacloprid. Arrows denote the lesions of hepatocyte vacuolation (fatty changes).



圖七、試驗農藥對各試驗組大鼠肝組織 gamma-GT 染色病理影響結果 (gamma-GT; 100X)。其中 C 代表 Chlorothalonil 縮寫，H 代表 Hexaconazole 縮寫，而 I 代表 Imidacloprid 縮寫。  
**Fig. 7.** Gamma-GT stain results showing the effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat livers (gamma-GT stain; 100X). C: Chlorothalonil, H: Hexaconazole, and I: Imidacloprid. Arrows denote gamma-GT positive lesions.

氯異苯腈試驗組之腎相對重量 ( $P < 0.05$ )，各試驗組動物腎平均相對重詳如圖八所示。

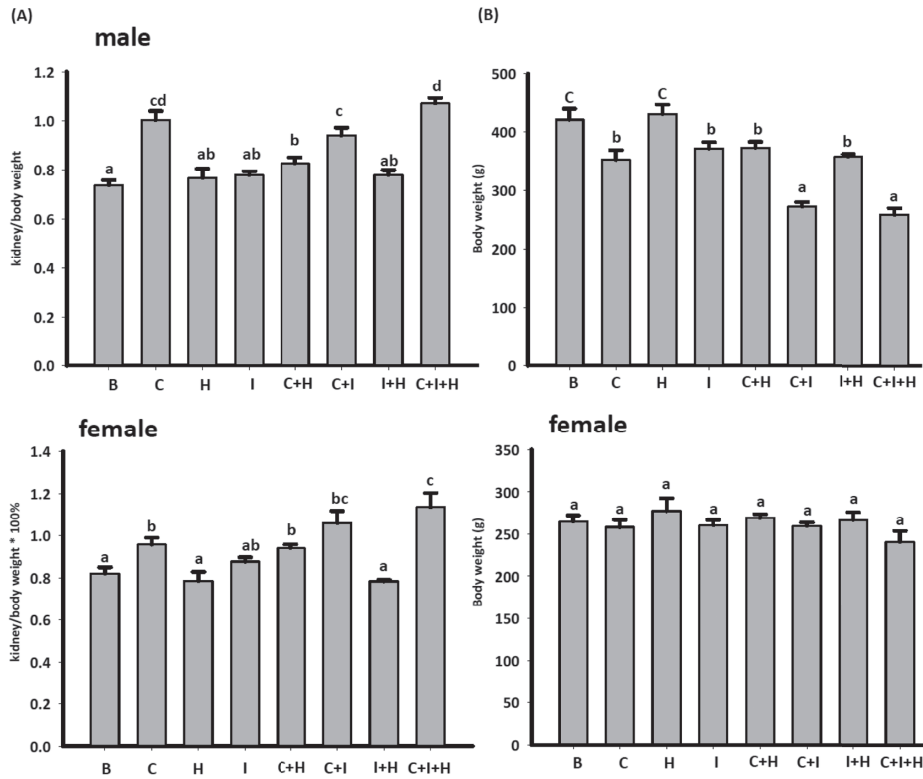
八、腎血清生化毒性指標酵素值之影響：(1) BUN 表現：無論雌雄鼠所有試驗組間對 BUN 表現均無差異 ( $P > 0.05$ )，各試驗組 BUN 腎毒性指標詳如圖九所示。(2) creatinine 表現：無論雌雄鼠所有試驗組間對 creatinine 表現上或有差異，但仍均在動物正常值表現範圍內，各試驗組 creatinine 腎毒性指標詳如圖十所示。

九、腎組織病理學之影響：剖檢肉眼各試驗組均無明顯腎肉眼病變；且於組織

病理學上各試驗組於腎組織均無明顯病變，各試驗組腎組織病理病變詳如圖十一所示。

十、腦組織病理學之影響：剖檢肉眼各試驗組均無明顯腦肉眼病變；且於組織病理學上各試驗組於腦組織均無明顯病變，各試驗組腦組織病理切片圖片資料並未呈現於此報告中。

十一、血清中乙醯膽鹼酯酶之影響：無論雌雄單一處理益達胺及混合處理四氯異苯腈與益達胺相較於對照組血清中乙醯膽鹼酯酶均無差異 ( $P > 0.05$ )，但混合處理益達胺與菲克利 (雄： $19.1 \pm 2.1$  units/L；雌：



圖八、試驗農藥對各試驗組動物 (A) 腎平均相對重與 (B) 體重影響結果。

**Fig. 8.** (A) Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the ratio of kidney weight to body weight in rats. (B) Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat body weight.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.

20.4 ± 2.2 units/L) 及混合 3 種農藥試驗組 (雄: 16.4 ± 1.1 units/L; 雌: 16.3 ± 0.6 units/L) 與對照組 (雄: 27.8 ± 1.3 units/L; 雌: 25.9 ± 1.9 units/L) 相較則明顯降低其血清中乙醯膽鹼酯酶量 ( $P < 0.05$ )，各試驗組血清中乙醯膽鹼酯酶表現詳如圖十二所示。

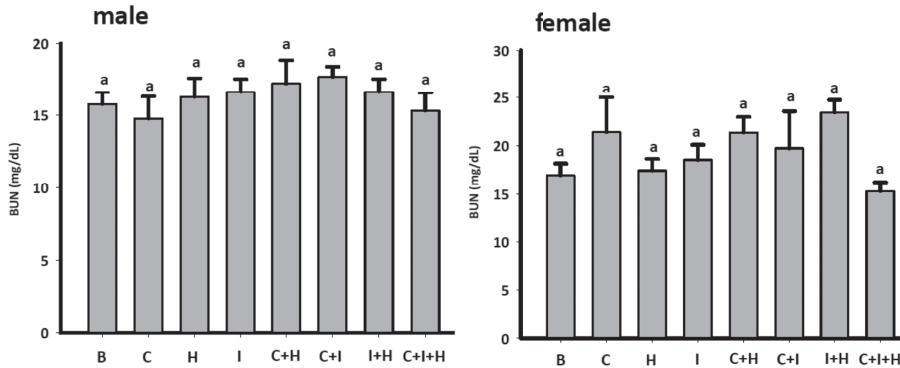
十二、肝臟 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6、CYP2C19 及 CYP3A4 等蛋白質 western

blotting 分析評估結果：所有試驗組間對 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6 及 CYP2C19 蛋白質表現上均無差異 ( $P > 0.05$ )，各試驗組 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6 及 CYP2C19 蛋白質表現詳如圖十三、十四及十五所示。所有試驗組間只有單一處理菲克利 (0.48 ± 0.12 fold of control) 及混合處理菲克利及益達胺 (1.72 ± 0.28 fold of control) 於 CYP3A4 指標

上與對照組相較具顯著差異外 ( $P < 0.05$ )，其餘各試驗組間均無差異 ( $P > 0.05$ )，各試驗組 CYP3A4 蛋白質表現詳如圖十六所示。

## 討論

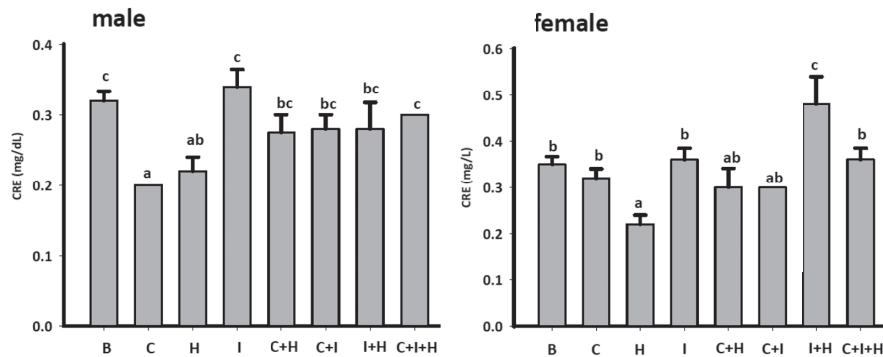
從本研究結果顯示，於死亡率上可見



圖九、試驗農藥對各試驗組血清中 BUN 影響結果。

**Fig. 9.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum BUN levels in rats.

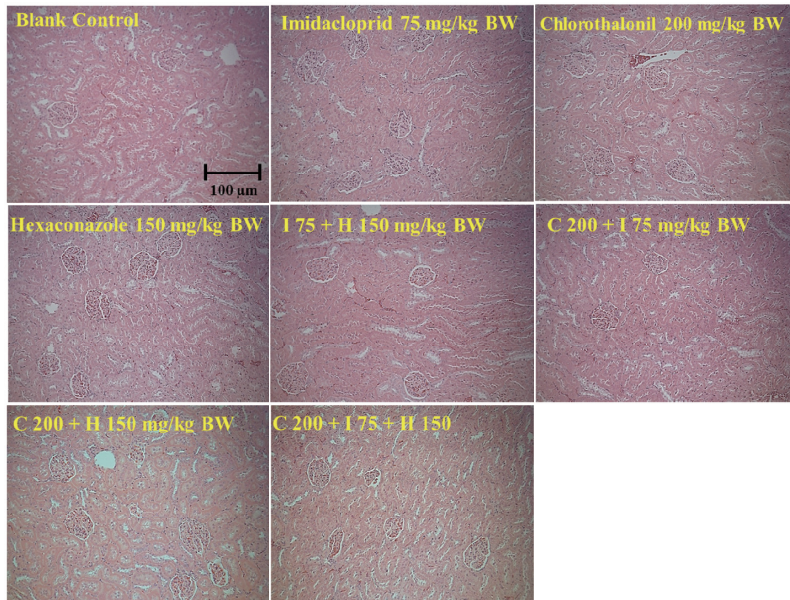
B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with the same letter (shown above bars) are not significantly different at a level of  $P > 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十、試驗農藥對各試驗組血清中 Creatinine 影響結果。

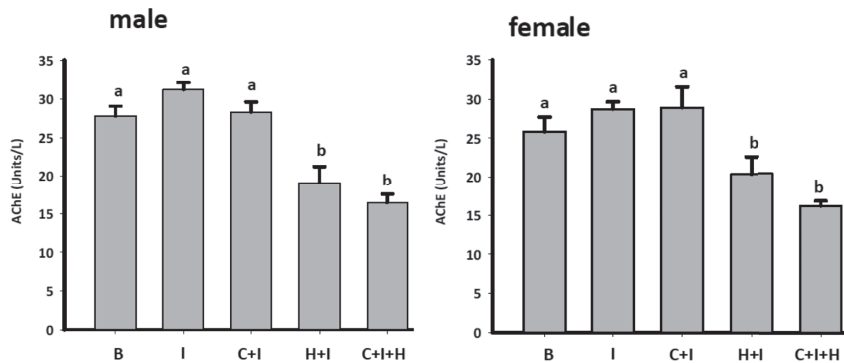
**Fig. 10.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum Creatinine levels in rats.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十一、試驗農藥對各試驗組大鼠腎組織病理影響結果 (H & E; 100X)。其中 C 代表 Chlorothalonil 縮寫，H 代表 Hexaconazole 縮寫，而 I 代表 Imidacloprid 縮寫。

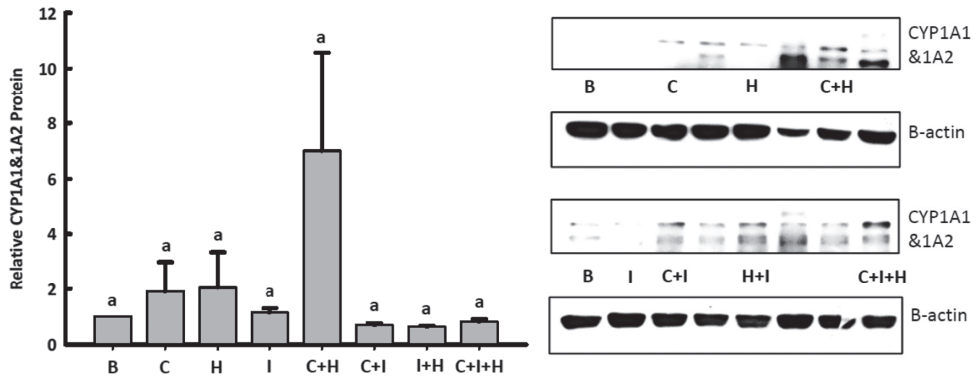
Fig. 11. Pathologic findings showing the effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on rat kidneys. (H & E stain; 100X). C: Chlorothalonil, H: Hexaconazole, and I: Imidacloprid.



圖十二、試驗農藥對各試驗組血清中乙醯膽鹼酯酶影響結果。

Fig. 12. Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on serum acetylcholinesterase levels in rats.

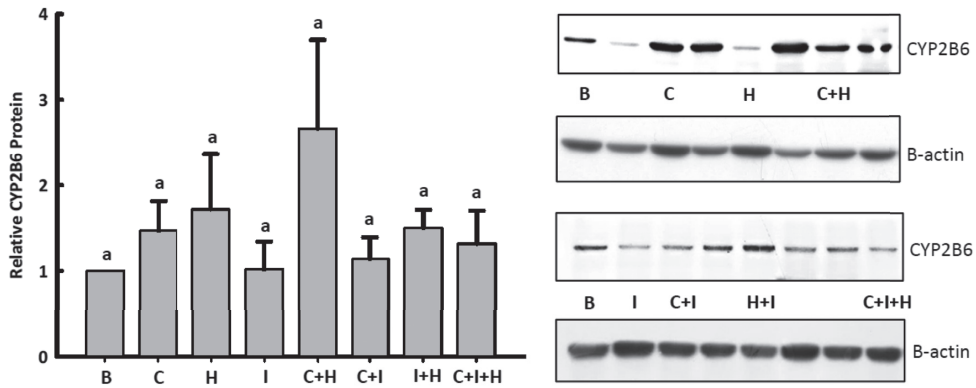
B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十三、試驗農藥對各試驗組大鼠肝中 CYP1A1 & 1A2 蛋白質影響結果。

**Fig. 13.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the protein expression levels of CYP1A1 & 1A2 in rat livers.

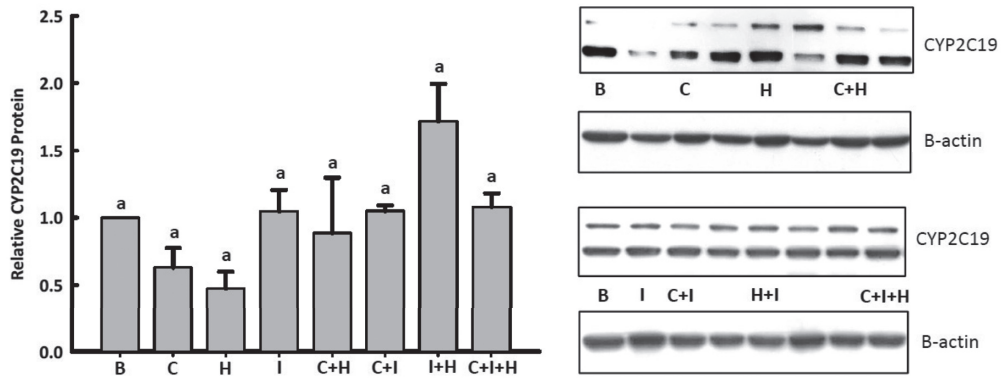
B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with the same letter (shown above bars) are not significantly different at a level of  $P > 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十四、試驗農藥對各試驗組大鼠肝中 CYP2B6 蛋白質影響結果。

**Fig. 14.** Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the protein expression level of CYP2B6 in rat livers.

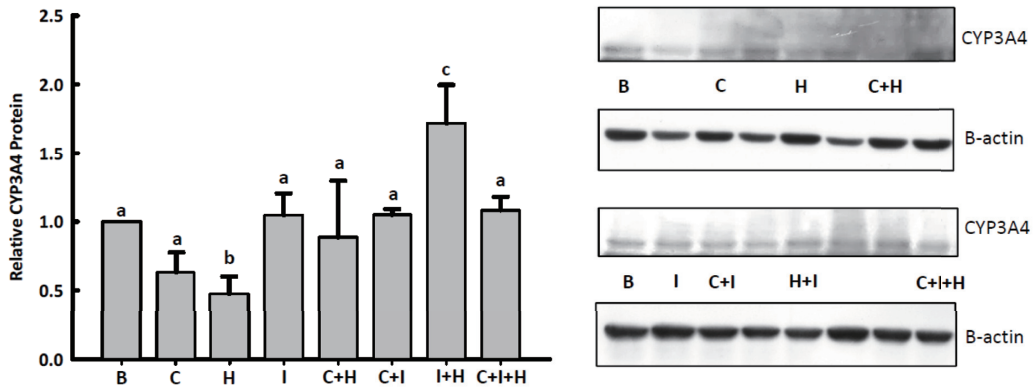
B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with the same letter (shown above bars) are not significantly different at a level of  $P > 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十五、試驗農藥對各試驗組大鼠肝中 CYP2C19 蛋白質影響結果。

Fig. 15. Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the protein expression level of CYP2C19 in rat livers.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with the same letter (shown above bars) are not significantly different at a level of  $P > 0.05$  according to Fisher's LSD test.



圖十六、試驗農藥對各試驗組大鼠肝中 CYP3A4 蛋白質影響結果。

Fig. 16. Effects of chlorothalonil, hexaconazole and imidacloprid on the protein expression level of CYP3A4 in rat livers.

B: Blank, C: Chlorothalonil (200 mg/kg), H: Hexaconazole (150 mg/kg), I: Imidacloprid (75 mg/kg). Means with different letters (shown above bars) are significantly different at a level of  $P < 0.05$  according to Fisher's LSD test.

含四氯異苯腈農藥之各試驗組均出現約 20% 之死亡率，但同時混合授予 3 種農藥之致死率反而降至 10%，顯示此 3 種農藥混合下於致死率上不具劑量相加效應。而單一處理菲克利、四氯異苯腈或益達胺農藥，分別產生肝細胞空泡及油紅染色之肝脂肪變性、ALT 下降現象與出現顫抖神經症狀之神經毒性等特異性表現，而經分別兩兩混合或混合 3 種上述農藥之試驗組對於單一農藥，所表現出之特異性毒性表現均不會明顯加重其毒性表現，且於其他非特異性毒性指標上如肝相對重、AST、gamma GT、BUN 及 creatinine 酵素表現上，經分別兩兩混合或混合 3 種上述農藥之試驗組相較於單一農藥亦均不會明顯加重其毒性表現，顯示此 3 種農藥混合不具劑量相加效應或毒性加乘協力作用；而只具同時表現其單一農藥產生之特異性毒性表現。其中為何 ALT 下降解釋為四氯異苯腈特異性指標，乃因文獻指出<sup>(19)</sup> 在四氯異苯腈短期試驗中會導致 ALT 下降。至於腎相對重量上無論雌雄均可見含四氯異苯腈農藥之各試驗組與對照相較明顯增加其腎相對重量，且同時混合含四氯異苯腈 3 種農藥試驗組確實加重同時混合含四氯異苯腈之 2 種農藥試驗組與單一四氯異苯腈試驗組之腎相對重量，是否代表四氯異苯腈在 28 天餵食期間下具有腎毒性，然而有關其他腎毒性指標上如 BUN 及 creatinine 卻均於正常值範圍內，雖然文獻中<sup>(20)</sup> 指出四氯異苯腈長期一年以上試驗下會產生腎小管增生病變，但由於本研究只授予 28 天之短期試驗，於腎組織之

顯微病變上均未見明顯的病變，因而可排除四氯異苯腈農藥於此 28 天餵食試驗中會導致腎毒性之產生，推論其腎相對重量上升之原因可能與體重下降所引起。另一方面針對無論雌雄單一處理益達胺及混合處理四氯異苯腈與益達胺相較於對照組血清中乙醯膽鹼酯酶均無差異之現象，無法解釋文獻上<sup>(6)</sup> 所描述益達胺會抑制乙醯膽鹼酯酶之神經毒性機制，可能之原因推論跟採樣時間與偵測樣品來源為血清有關，通常在分析腦中與紅血球中乙醯膽鹼酯酶原本就較為敏感<sup>(6)</sup>，但無論如何因動物臨床上明顯出現顫抖神經症狀，所以推論單一處理益達胺及混合處理四氯異苯腈與益達胺仍具神經毒性。綜觀本研究之驗證結果可推論當多重農藥作用於不相同之毒性作用機制時，多重農藥之毒性為個別農藥毒性反應表現之結果。以目前農藥在 ADI 之推算，至少必需低於各種慢毒試驗之最低無毒害劑量的 1/100 以下，易言之，每一種農藥的容許量標準，都超過每天強迫取食之實驗數據可能產生健康危害的 100 倍以上，且本研究所進行的劑量更是個別農藥 ADI 之 1,000 倍以上，菲克利、四氯異苯腈與益達胺授予劑量分別為其 ADI 之 30,000、6,700 及 1,250 倍，偶而檢出殘留量超倍的數據，仍在安全閾界內而不具明顯毒性反應之風險，推論單一農藥均未達最低無毒害劑量，因此混合暴露不同毒性作用機制下均不會表現其單一農藥之毒性反應，因而現況上不致於有毒性反應獨立表現效應之混合毒性效應存在。另外毒性作用機制基於科學

毒理研究上是非常具有特異性與專一性的，所以不會有不同作用機制卻有相同毒性作用之多重農藥情形產生，但較有可能的情形是農藥具多種毒性作用機制，如可能同時產生肝臟、腎臟或其他類型之毒性作用，但無論其可能產生多少種之毒性作用，當初在訂定 ADI 值時，乃採參考最為關注之毒性作用之最低暴露濃度，易言之雖然其會產生多種毒性作用，但只要暴露量把關在 ADI 之下，就不易產生任何一種之有害之毒性表現。

本研究之評估藥劑均為作用在不同毒性作用機制之農藥，至於作用在相同毒性作用機制之多重農藥混合毒性，目前研究較為透徹，如美國環保署已針對相同毒性作用機制農藥如有機磷、氨基甲酸鹽、triazines、除蟲菊類 (pyrethrins) 及 chloroacetanilides 等 5 類農藥均已完成其風險評估<sup>(14, 15)</sup>，本文作者亦已於 2012 年完成三唑類農藥之驗證試驗 (結果尚未發表)。研究指出當多重農藥作用於相同之毒性作用機制時，多重農藥之毒性為個別農藥毒性相加之結果，即劑量相加效應，適用於農藥之累積性風險評估。相關累積毒性風險評估說明為：(1) 假設 A、B、C 等三個藥劑均具有相同之毒性作用機制；(2) 以 A 藥為毒性指標標杆藥劑，將 A 藥之毒力相當因子 (toxicity equivalency factor, TEF) 設為 1，則 B 藥之 TEF 為  $ADI_A/ADI_B$  或  $NOAEL_A/NOAEL_B$ ；C 藥之 TEF 為  $ADI_A/ADI_C$  或  $NOAEL_A/NOAEL_C$ ；(3) 三藥殘留暴露量 (exposure dose, ED) 單一分別為  $ED_A$ 、 $ED_B$  及  $ED_C$ ；(4) 則三藥之農藥累積殘

留暴露量 (accumulation exposure dose,  $ED_{accumulation}$ ) 相對於 A 藥 (毒性指標標杆藥劑) 為： $ED_{accumulation} = ED_A \times TEF_A + ED_B \times TEF_B + ED_C \times TEF_C$  即為： $ED_{accumulation} = ED_A \times 1 + ED_B \times (ADI_A/ADI_B) + ED_C \times (ADI_A/ADI_C)$ ；(5) 三藥之農藥累積殘留風險指標 (accumulation hazard index;  $HI_{accumulation}$ ) 為： $HI_{accumulation} = HI_A + HI_B + HI_C$ ，即為： $HI_{accumulation} = (ED_A/ADI_A) + (ED_B/ADI_B) + (ED_C/ADI_C)$ 。本研究之結果顯示混合 3 種菲克利、四氯異苯腈或益達胺等不同毒性作用機制農藥，並不具累積殘留風險。目前臺灣所有作物上相同農藥之加總殘留容許量，必需低於 ADI 的 80%，且實際於田間施用時，農民基於經濟效益上之考量，顯少會同時使用 2 種以上具相同毒性作用機制之農藥，並已以相關公式初步實際試算後 (結果尚未發表)， $HI_{accumulation} < 1$  表示此混合累積殘留是安全可接受，現況上不致於有劑量相加之累積毒性風險存在。

最後有關本研究中之 3 種農藥間是否具交互作用之問題探討上，學理上農藥間之交互作用可區分為以下 3 種<sup>(4, 7)</sup>：(1) 農藥與農藥間直接交互作用 (direct pesticide-pesticide interaction)：當一種農藥直接與另一種農藥引起化學反應而產生另一種化學結構之農藥，這將導致混合後毒性的變化，而引起更強或更弱的毒性作用。(2) 毒物代謝動力學 (toxicokinetics)：當多重農藥進入哺乳動物體內代謝 (metabolism) 後，一種農藥會引起另一種農藥主要毒性代謝物內部劑量 (internal dose) 的改變。(3) 毒物效應動力學 (toxicodynamics)：當多重農藥進入哺

乳動物體內代謝後，當一種農藥並不會引起另一種農藥主要毒性代謝物內部劑量的改變時，但是確會相互影響農藥間毒性作用之細胞受體位置 (cellular receptor site) 或標的分子 (target molecule) 而引起毒性之改變。針對毒物代謝動力學上所引起農藥之交互作用而導致毒性加乘協力作用，目前有研究指出，於高劑量下協力精 (piperonyl butoxide) 與氨基甲酸鹽或除蟲菊類農藥混合下會大量抑制單加氧酶而導致氨基甲酸鹽或除蟲菊類農藥對昆蟲之毒性加乘提高分別為 200 倍與 60 倍之毒性<sup>(18)</sup>。但對於實際殘留量非常低是否具農藥間交互作用是非常難預測地，且發生機率非常低，原因為基於毒理學理論上，要產生農藥間之交互作用需於非常高之劑量下，需要高到一定劑量，而能達到不同毒性之閾值 (thresholds) 與飽和 (saturation) 點時方會發生。每一種農藥都有其獨特之毒性作用機制，並不會因為多重農藥殘留後，而改變單一農藥之毒性作用機制，即不會產生一種類似新的農藥，而有更毒之毒性效應<sup>(2)</sup>。

每一個化學物質進到動物體內於肝臟中都會透過特定之 CYP 進行代謝，有研究指出<sup>(5)</sup> 參與農藥肝臟中代謝作用之 CYP 種類約有 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP3A4、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A5 及 CYP3A7 等 11 種，主要參與農藥代謝過程中前 4 個 CYP 為 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6、CYP2C19 及 CYP3A4，分別占參與農藥代謝過程中之 17%、12%、15% 及 24% 比例，

其餘 7 種 CYP 如 CYP2C9 均只占參與農藥代謝過程中之 10% 以下比例。在針對肝組織中代謝酵素 cytochrome P450 研究上，選擇主要<sup>(3)</sup> 參與農藥代謝過程中的 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6、CYP2C19 及 CYP3A4 等 4 種肝代謝酵素 cytochrome P450 進行分析，本研究結果顯示所有試驗組間對 CYP1A1 & 1A2、CYP2B6 及 CYP2C19 蛋白質表現上均無差異，而所有試驗組間只有單一處理菲克利及混合處理菲克利及益達胺對 CYP3A4 與對照相較具顯著差異外 ( $P < 0.05$ )，其餘各試驗組間均無差異 ( $P > 0.05$ )，且單一處理菲克利與對照相較對 CYP3A4 下降之比例不到 2 倍，而混合處理菲克利及益達胺與對照相較對 CYP3A4 上升之比例亦不到 2 倍，未達到引起毒性代謝交互作用之閾值與飽和點，因此推論 3 種農藥間不具有毒性代謝交互作用。另外文獻上<sup>(3)</sup> 指出 CYP3A4 與有機磷類農藥如陶斯松 (chlorpyrifos) 及氨基甲酸鹽類農藥如加保扶 (carbofuran) 較為相關，因此推論菲克利及益達胺是否會與有機磷及氨基甲酸鹽類農藥產生代謝上之交互作用，仍需進一步進行試驗加以釐清。綜觀現有的科學研究，尚無針對多種混合各種不同作用機制的農藥，作各種組合的毒性作用探討，但彙整現有的登記農藥審查管理機制、國際多種農藥資料及進行相關驗證試驗之結果後，加上農藥使用者通常不會將同一類殺蟲作用機制或相同毒性作用機制之同類型農藥同時使用，因此對於蔬果作物所驗出之低濃度多重農藥殘留產生雞尾酒效應極低。然而人們飲食

生活習慣常有可能同時接觸到許多種不同的化合物，而這些化合物又可能與食物中特定成分甚至是治療藥物同時暴露，其複雜性之高仍有待持續研究及找尋更合適的評估方法才能完全加以釐清。

## 謝辭

本研究由行政院農業委員會 104 年農科 -10.8.1- 藥 -P2(2) 計畫經費補助。試驗期間蒙張麗煌、邱秀英及高鳳凰小姐等協助，謹此誌謝。

## 引用文獻

1. 王明升、余玉林、余俊強、宋永義、李碧珍、林宗德、林宗毅、周京玉、洪昭竹、翁仲男、秦咸靜、梁善居、許桂森、陳保基、張維正、黃英豪、葉力森、廖欽峰、蔡倉吾、蘇怡欣 編。2010。實驗動物管理與使用指南（第三版擴充版）。行政院農業委員會。臺北。270 頁。
2. 楊俊宏、林天宇、蔡建任。2015。蔬果多重農藥殘留之風險研究簡介。農政與農情 275: 97-100。
3. Abass, K., Reponen, P., Mattila, S., and Pelkonen, O. 2010. Metabolism of carbosulfan II. Human interindividual variability in its in vitro hepatic biotransformation and the identification of the cytochrome P450 isoforms involved. *Chem. Biol. Interact.* 185: 163-173.
4. ATSDR. 2001. Guidance for the preparation of an interaction profile. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, USA. 86 pp.
5. Hodgson, E. 2003. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related compounds used in agriculture and public health, May 2003. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17: 201-206.
6. Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., and Kawano, H. 2012. Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats. *PLoS One* 7: e32432.
7. Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 2008. Combined toxic effects of multiple chemical exposures. Vitenskapsskomiteen for mattrygghet / Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo, Norway. 105 pp.
8. Organization for Economic Cooperation and Development. 1995. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD guideline for the testing of chemicals. Section 4: health effects, no. 407. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. 8 pp.
9. Reffstrup, T. K., Larsen, J. C., and Meyer, O. 2010. Risk assessment of mixtures of

- pesticides. Current approaches and future strategies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 56: 174-192.
10. Rutenburg, A. H., Kim, H., Fischbein, J. W., Wasserkrug, H. L., and Seligman, A. M. 1969. Histochemical and ultrastructural demonstration of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 17: 517-526.
  11. Shackelford, C., Long, G., Wolf, J., Okerberg, C., and Herbert, R. 2002. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 30: 93-96.
  12. Teuschler, L. K. 2007. Deciding which chemical mixtures risk assessment methods work best for what mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223: 139-147.
  13. United States Environmental Protection Agency. 1996. Pesticide tolerance for hexaconazole. *Federal Register* 61: 3363-3365.
  14. United States Environmental Protection Agency. 2000. Cumulative risk: a case study of the estimation of risk from 24 organophosphate pesticides. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. 101 pp.
  15. United States Environmental Protection Agency. 2001. Memorandum from Marcia E. Mulkey to Lois Rossi. Implementation of the determinations of a common mechanism of toxicity for N-Methyl carbamate pesticides and for certain chloroacetanilide pesticides. Available at <https://www.regulations.gov/contentStreamer?documentId=EPA-HQ-OPP-2006-0202-0006&disposition=attachment&contentType=pdf>
  16. United States Environmental Protection Agency. 2000. Supplementary guidance for conducting health risk assessment of chemical mixtures. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. 209 pp.
  17. United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. 2000. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, OPPTS harmonized test guidelines, series 870.3050, EPA 712-C-00-366, Washington, DC, USA. 9 pp.
  18. Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., and Peakall, D. B. 2012. Principles of ecotoxicology, 4th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 386 pp.
  19. Wilson, N. H., Killeen, J. C., Haley, B. L., and Ignatoski, J. A. 1984. A subchronic toxicity study of technical chlorothalonil in rats. Document number 562-5TX-81-0213-004-001. SDS Biotech Corporation. DPR Vol. 275-107 #34377.

20. Wilson, N. H., Killeen, J. C., and Ignatoski, J. A. 1985. Histopathologic re-evaluation of renal tissue from a subchronic toxicity study of technical chlorothalonil in rats. Document number 753-5TX-85-0056-002. SDS Biotech Corporation. DPR Vol. 275-108 #34374.

# Evaluation of Imidacloprid, Hexaconazole and Chlorothalonil Three Pesticides Mixture Toxicity Effects

Chun-Hung Yang<sup>1\*</sup>, Tian-Yu Lin<sup>1</sup>, Wei-Ren Tsai<sup>1</sup>

## Abstract

Yang, C. H., Lin, T. Y., and Tsai, W. R. 2016. Evaluation of imidacloprid, hexaconazole and chlorothalonil three pesticides mixture toxicity effects. *Taiwan Pestic. Sci.* 1: 1-23.

Pesticides are indispensable to agriculture as they protect plants from disease and improve agricultural production. However, pesticides are associated with cumulative or mixture risks when excessive amounts of mixed pesticide residues are ingested (typically from consuming fruits and vegetables). Therefore, comprehensive risk assessments of pesticide mixtures are critically important. Previous studies have shown that imidacloprid, hexaconazole, and chlorothalonil pesticides can induce neurotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic reactions, respectively. The present study addresses the mixed neurotoxic, hepatotoxic, and nephrotoxic effects of imidacloprid, hexaconazole, and chlorothalonil by combining these three pesticides (which act independently and have different toxicity modes of action) in a 28-day oral subacute toxicity assay. Treating rats with a combination of 75 mg/kg/day imidacloprid (about 1,250 fold of ADI), 150 mg/kg/day hexaconazole (about 30,000 fold of ADI), and 200 mg/kg/day chlorothalonil (about 6,700 fold of ADI) induced simultaneous clinical sign of convulsions, hepatocyte vacuolations (fatty changes), and reductions in ALT levels. However, there is no evidence that exposure to the combination of these three pesticides can aggravate clinical convulsions, hepatocyte vacuolations, or ALT level hepatotoxicity caused by exposure to a single pesticide or different combinations of two pesticides. Our findings demonstrate that the combination of imidacloprid, hexaconazole, and chlorothalonil pesticides do not have dose additive (cumulative) or synergistic effects in rats.

**Key words:** interaction, synergy, mixtures, dose additivity, accumulation risk assessment, antagonism.

---

Accepted: September 10, 2016.

\* Corresponding author, Email: yjh@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung.