

天然植物保護資材商品化研發—毒理試驗運作平臺執行成效

張敬宜^{1*} 莊伊靜¹ 羅紹榮¹ 吳偉嘉¹ 謝再添¹ 蔡建任¹

摘要

張敬宜、莊伊靜、羅紹榮、吳偉嘉、謝再添、蔡建任。2018。天然植物保護資材商品化研發—毒理試驗運作平臺執行成效。臺灣農藥科學 4: 1-19。

天然植物保護資材常被認為是對人畜安全性與環境友善度較高的產品，為加速這類產品研發上市、補強產品關鍵技術缺口及克服法規登記障礙，農業藥物毒物試驗所（以下簡稱藥毒所）形成跨機關及跨領域之研發團隊（包含毒理學、獸醫學及生物學等專業技術領域人員），共同推動建構天然植物保護資材商品化技術平臺，主要先盤點各試驗改良場所及大專院校較有市場潛力之產品，補強其商品化登記資料，以利產品之技術移轉與登記上市。本文敘述 1. 生物農藥毒理試驗登記要件與各國法規要件之研析，2. 並介紹毒理試驗需求之判斷依據與參考之試驗指引，及各項急性毒性試驗與非目標生物毒性試驗之毒性分類參考標準，3. 進行產品登記所需毒理試驗需求之評估與製備。本計畫平臺共盤點 26 項產品，其中 22 項產品完成毒理試驗需求評估與毒理試驗資料之製備，共計完成 62 份符合優良實驗室操作（Good Laboratory Practice, GLP）試驗規範之毒理試驗報告。結果顯示經安全測試與評估後，這些產品均屬於較安全的天然資材產品，其口服急毒性等級均介於輕毒至低毒，惟部分產品如 TK99 SC、乳化植物油製劑、五倍子萃取溶液、肉桂油乳劑、液體皂植保製劑、植物油混方、草酸液劑、百里酚蒸散劑及甲酸膠體等 9 項產品刺激性較強或具潛在皮膚過敏性，施用時需戴護目鏡與手套，並需在產品包裝上加註警語。整體而言，本試驗研究平臺已成功的建立高安全性天然植物保護資材登記典範，從而使登記流程與要件更透明化，並透過此平臺輔導交流，加速研發者完成產品登記所需資料要件，縮短國內登記與上市時程，提高生物農藥市場的選擇性與多樣性，以進而

接受日期：2018 年 9 月 4 日

* 通訊作者。E-mail: jinyi@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

促進有機農業發展。本平臺出具符合國際認可的 GLP 規範毒理試驗報告，可拓展產品進軍國際市場。未來仍可持續藉由運作此商品化技術平臺，加速各類生物農藥上市及取代部分化學農藥，達成有機化學農藥減量、強化安全使用優質農產品及商品國際化之最終目的。

關鍵詞：天然植物保護資材、商品化平臺、毒理試驗、GLP 試驗規範、毒性分類標準

緒言

隨著食品安全及環保意識的抬頭，以及國民生活品質與有機農業市場需求提高，使得高安全性的天然植物保護資材是近 10 年來國內外專家在病蟲害防治管理上，積極研發的方向與重點，主要優點為可減少及取代部份化學農藥的使用，進而降低病蟲害對化學農藥抗藥性的產生及環境之污染，並減少對非目標生物的衝擊和生態平衡之破壞等問題⁽⁶⁾。天然植物保護資材係屬生物農藥，此類資材源自天然，可為植物源、動物源或礦物源，其中以中草藥之植物萃取物及植物精油為大宗。例如，從印楝樹萃取之印楝素可干擾害蟲之蛻皮，並有顯著忌避與取食抑制作用；苦參萃取之苦參鹼可當殺蟲劑，對昆蟲具有胃毒性，主要影響害蟲神經系統與造成蛋白質變性（藥毒所農藥資料庫）；香茅萃取的香茅精油及其他如薄荷精油、薰衣草精油、小茴香精油、八角茴香精油等，對害蟲具有忌避作用⁽¹⁾。

天然植物保護資材因取自天然，常被

直接認定其安全性高，而間接忽視其毒性。然農藥的發展歷史，在化學農藥問世前，科學家早期已知道利用天然植物或其所含成分來防治害蟲，如除蟲菊、苦楝及魚藤。唯天然的素材不等同於低毒，化學合成的物質亦未必較毒，所有物質未被徹底研究與評估毒性之前，易被誘導為安全甚至對環境友善⁽⁸⁾，如 1690 年開始被歐洲人做為殺蟲劑使用之菸草葉萃取物，其主要有效成分為菸鹼，又名尼古丁，對昆蟲具有胃毒、接觸毒及薰蒸毒之作用機制，同時對人畜也具有毒性⁽⁴⁾。又如植物皂素是植物的二次代謝產物，存於許多植物中，其對水田軟體動物如福壽螺等，有顯著的毒殺作用，但對魚類等水生生物則屬劇毒。因此，毒理試驗資料在農藥登記過程中占很重要的份量，同時也是產業化研發費用支出最大的一環結，主要目的為釐清研發產品是否對人體健康有潛在危害及對環境非目標生物造成影響。

綜觀國內研發的天然植物保護資材要登記上市，毒理試驗資料為必備需求。因此，藥毒所推動此平臺目的為支援天然植物保護資材商品化及有效應用之整合性計

畫，分工上補強其商品化毒理安全關鍵技術的缺口，以利產品之技轉與合法登記上市。同時配合平臺運作，進行生物農藥毒理試驗登記要件與各國法規要件之研析、說明毒理試驗需求判斷依據與參考試驗指引、各項急性毒性試驗與非目標生物毒性試驗之毒性分類參考標準，及參考國際試驗指引進行各項符合 GLP 規範之毒理試驗，以強化這些研發產品對人體健康安全評估，或使用範圍上的限制與必需的防護措施，進而加速產品完成技轉與登記上市，以減少化學農藥之使用，提高農產品之安全，達到安全農藥與環境永續經營之目標，並可提升部分產品競爭力及國際化⁽⁸⁾。

生物農藥毒理試驗要件與法規研析

依據我國農藥管理法之「農藥理化性及毒理試驗準則」規定⁽²⁾，生物農藥依其性質與來源可區分為天然素材 (natural products)、微生物製劑 (microbial formulations) 及生化製劑 (biochemical formulations) 三類，所需的毒理試驗項目要件不一樣。本研究對象主要為天然素材與生化製劑中的費洛蒙類 (pheromones) 農藥。天然素材農藥係指天然產物之有效成分無法以化學方法純化或再加以合成之農藥，可經粗萃、脫水、乾燥、壓榨、磨粉、製粒等物理及適當調配加工程序之製劑，登記上一般以成品為主，其毒理試驗

項目需求得由中央主管機關依其性質，視個案需要指定所需之急性毒性及非目標生物毒性試驗。費洛蒙在我國生化農藥法規具獨立之毒理試驗項目需求，一般而言，若費洛蒙成品使用時，定置於釋放裝置內而未直接接觸作物，可預期對人類健康無風險性及對環境無不良影響，得免提供成品毒理試驗資料；費洛蒙原體屬於特性明確且與已登記的鱗翅目直鏈式費洛蒙 (Straight Chain Lepidopteran Pheromones, SCLPs) 同一化學結構群，免提供原體毒理試驗資料，若非該化學結構群者且原體使用量每年不超過 375 g/ha，只需提供一項致變異性試驗資料⁽²⁾。

另外，本研究盤點的產品中，有 3 項產品之有效成分源自天然產物，但因需求量與成本的考量下，改以化工原料調配，此類產品經平台毒理專家評估後，依其農藥分類屬性，應不屬於天然素材與生化農藥，實屬有機化學製劑農藥，但該等產品符合有機化學製劑農藥毒理試驗項目的規定「以具農藥用途外其他廣泛用途之化工原料加工而成之成品農藥，得免提供原體之毒理試驗資料，惟新有效成分者其成品農藥依新劑型或含量辦理」，因此毒理資料必備要件為口服與皮膚急毒性及眼刺激性，而呼吸急毒性、皮膚刺激性及皮膚過敏性則依產品劑型、使用情況或使用時可能與皮膚接觸頻繁者等視情況要求⁽²⁾。

各國法規研析方面^(2, 9, 17, 18)，美國針對天然存在的農藥 (naturally-occurring pesticides) 歸屬於生化農藥，我國則將其

與生化農藥區隔，單獨分為天然素材類，兩者均屬於生物農藥的範疇。由表一可知，我國生化農藥毒理試驗要求與美國生化農藥毒理試驗要求類似，原體除需急性毒性及非目標生物毒性試驗外，若使用於食用作物上，尚需 90 天餵食試驗、出生前發育毒性試驗及致變異性試驗，而成品方面則是美國與澳洲相同，皆需 6 項急性毒性試驗資料。我國天然素材農藥的毒理需求則視個案性質繳交成品急性毒性資料，與美國及澳洲的生化農藥成品要求較相近。

經濟合作與發展組織 (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) 則將生物農藥分為 4 類⁽¹⁵⁾，其中 1 類為植物萃取物 (plant extracts)，亦就是植物源 (Botanical) 類，但至今除了 Botanical 類外，其他 3 類均有公告其

登記資料需求指引文件。另外，歐盟 (European Union, EU) 在 2014 年公告針對「植物源有效物質 (Botanical active substances)」做介紹之指引文件⁽¹¹⁾，其指的就是 OECD 所稱之植物萃取物，依其定義屬於我國的天然素材類，亦依風險性採個案要求。例如，具有人類安全消費歷史、已在醫藥或臨床研究上使用、具有毒性相關報導 (如對禽畜發生毒性危害事件) 等，均算是科學性佐證資料，只要所繳交的毒理資料可證明在建議的使用方法下，不會對人類造成健康危害或引起不良反應的特性證據已足夠，如已知會造成人類皮膚過敏性的，是可免除非必要的動物試驗。Botanical 類在歐盟最新的農藥管理 (Regulation 2017/1432) 分類上⁽¹²⁾，屬於「低風險物質 (low risk substances)」類

表一、各國法規對天然資材產品毒理安全資料要求之比較¹⁾

Table 1. A comparison of toxicological data requirements for the registration of natural and biochemical pesticide products between Taiwan and other countries¹⁾

Item	Taiwan ²⁾		Taiwan ³⁾		USA ⁴⁾		Australia ⁵⁾	
	EP		TC	EP	TC	EP	TC	EP
Acute oral toxicity	△		○	○	○	○	○	○
Acute dermal toxicity	△		○	○	○	○	○	○
Acute inhalation toxicity	△		○	○	○	○	○	○
Acute eye irritation	△		○	○	○	○		○
Acute dermal irritation	△		○	○	○	○		○
Skin sensitization	△		△	△	○	○		○
Genotoxicity			○		○		○	
Aquatic toxicity	△		△		○	○		
Other (ex. 90-day toxicity)			○		○		○	

¹⁾ TC: technical; EP: end product; ○: Required; △: Conditionally required.

²⁾ Pesticide management regulations for natural products in Taiwan.

³⁾ Pesticide management regulations for biochemical pesticides in Taiwan.

⁴⁾ 40 CFR. 158.2050, 158.2060.

⁵⁾ Guidelines for the registration of biological agricultural products in Australia.

(新公告分類) 之物質，其毒理資料要件是以排除法證明，符合 low risk substances 的要求，例如不具致癌性、不具致變異性、不具生殖毒性....等。

毒理試驗需求之判斷依據與試驗指引

我國農藥管理法規中對天然素材類的毒理試驗項目需求如前述，視個案需要指定所需之毒性試驗。一般而言，為瞭解產品毒性等級與刺激性，口服急毒性與眼刺激性為基本必備資料，其餘視產品組成成分安全性，並參考產品劑型與田間使用方法，評估各產品所需之毒理試驗⁽⁸⁾。其判斷依據 (1) 參考過去已登記的成品農藥中，尚未有皮膚暴露毒性較口服暴露高，因此對高安全性的天然素材農藥，除非其口服急毒性屬於中等毒以上者，才要求需再提供皮膚急毒性試驗；(2) 固體形態的粉劑因有粉塵吸入風險疑慮，常要求提供呼吸急毒性試驗；液劑因考量易由皮膚吸收風險，尤其是乳劑需提供皮膚過敏性試驗；(3) 當眼刺激性結果為中度刺激以上者，則需再提供皮膚刺激性試驗；(4) 若使用於水生作物，則需提供水生生物毒性試驗，包括淡水魚類急毒性與淡水無脊椎生物急毒性試驗；(5) 施用對象為蜜源或粉源植物，則需提供蜜蜂急毒性試驗，包括蜜蜂成蟲口服急毒性與接觸急毒性試驗。最後還需依據上述的毒性資料對產品做綜合性安全評估，如有出現神經毒症狀

或其他安全疑慮時，則另需提供出生前發育毒性試驗或 28 天甚至 90 天餵食性毒性試驗，並依試驗結果說明產品之安全性或使用上之注意事項，如建議加註警語或毒性等級。

藥毒所自從 2010 年開始提供業界產品符合 GLP 之毒理安全性委託試驗服務，累積多年的豐富經驗可協助研發產品製備毒理試驗登記資料，且本計畫的毒理試驗運作平臺是由不同領域的實驗室組成之合作團隊。每項試驗均遵循 OECD 之優良實驗室操作規範⁽¹³⁾及參考美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA)⁽¹⁶⁾ 或 OECD 試驗指引⁽¹⁴⁾ 操作，且不同毒性試驗有不同參考之試驗指引 (表二)，本計畫運作平臺計可協助 10 項毒性試驗，未來將持續擴增鳥類口服急毒性與蚯蚓毒性試驗等委託試驗服務。

毒性試驗之毒性分類參考標準

急性毒性試驗為評估毒理安全之重要試驗，可由不同途徑暴露測試物瞭解對哺乳動物急性毒性及刺激性，作為毒性分類及標示之依據。急性毒性試驗包括口服急毒性、皮膚急毒性、呼吸急毒性、眼刺激性、皮膚刺激性及皮膚過敏性等 6 項。口服急毒性、皮膚急毒性及呼吸急毒性試驗主要觀察 14 天內引起的急性致死毒性^(7,8)，並估算其導致半數動物死亡之劑量或濃度值 (median lethal dose, LD₅₀ 或 medi-

an lethal concentration, LC_{50})，依其數值可分為極劇毒 (extremely toxic)、劇毒 (highly toxic)、中等毒 (moderately toxic)、輕毒 (slightly toxic) 及低毒 (practically non-toxic) 等 5 個等級 (表三)，如口服急性毒性 $LD_{50} > 5,000$ mg/kg 為低毒、 $> 2,000 \sim$

表二、毒性試驗之國際規範指引

Table 2. The international test guidelines for toxicity test

Toxicity test	Test type	Test guideline
Acute toxicity test	Acute oral toxicity	OECD test guideline 425 (Up and down procedure) US EPA test guideline OCSP 870.1100
	Acute dermal toxicity	OECD test guideline 402 US EPA test guideline OCSP 870.1200
	Acute inhalation toxicity	OECD test guideline 403 US EPA test guideline OCSP 870.1300
	Acute eye irritation	OECD test guideline 405 US EPA test guideline OCSP 870.2400
	Acute dermal irritation	OECD test guideline 404 US EPA test guideline OCSP 870.2500
	Skin sensitization	OECD test guideline 442B (Local lymph node assay)
Non-target organism toxicity test	Fish acute toxicity	OECD test guideline 203 USEPA test guideline OCSP 850.1075
	Daphnia sp. acute toxicity	OECD test guideline 202 USEPA test guideline OCSP 850.1010
	Honey bee acute oral toxicity	OECD test guideline 213
	Honey bee acute contact toxicity	OECD test guideline 214
	Avian acute oral toxicity	OECD test guideline 223 USEPA test guideline OCSP 850.2100
	Earthworm acute toxicity	OECD test guideline 207

表三、口服、皮膚及呼吸急毒性分類標準

Table 3. Classification of acute oral, dermal and inhalation toxicity

Classification	Acute oral toxicity LD_{50} (mg/kg) ¹⁾	Acute dermal toxicity LD_{50} (mg/kg) ¹⁾	Acute inhalation toxicity LC_{50} (mg/L) ²⁾
Extremely toxic	≤ 5	≤ 50	≤ 0.05
Highly toxic	$> 5 \sim \leq 50$	$> 50 \sim \leq 200$	$> 0.05 \sim \leq 0.5$
Moderately toxic	$> 50 \sim \leq 2,000$	$> 200 \sim \leq 2,000$	$> 0.5 \sim \leq 1.0$
Slightly toxic	$> 2,000 \sim \leq 5,000$	$> 2,000 \sim \leq 5,000$	$> 1.0 \sim \leq 5.0$
Practically non-toxic	$> 5,000$	$> 5,000$	> 5.0

¹⁾ Official pesticide toxicity classification in Taiwan.²⁾ Reference standard. Refer to the GHS toxicity classification standard.

$\leq 5,000$ mg/kg 為輕毒、 $> 50 \sim \leq 2,000$ mg/kg 為中等毒、 $> 5 \sim \leq 50$ mg/kg 為劇毒及 ≤ 5 mg/kg 為極劇毒，其中呼吸急毒性常因劑型的不同、物理化學特性的影響及呼吸暴露艙的限制，導致常無法進行更高濃度的試驗，因此國際間僅將此呼吸急毒性分類列為農藥毒性等級之參考^(5, 8)。

眼刺激性與皮膚刺激性試驗^(7, 8)，試驗觀察最多分別至 21 天與 14 天為止，若於 72 小時已無刺激反應，則不需再繼續觀察，刺激性等級可分為嚴重、中度、輕

微及無刺激性等 4 個等級 (表四)。皮膚過敏性試驗，主要以小鼠局部淋巴結分析 (local lymph node assay, LLNA) 方法，分析淋巴結細胞增生程度之刺激指數 (stimulation index, SI)^(3, 7, 8)。依偵測細胞增生結果方式的不同可分為 3 種方法，包括放射性物質標定法、Daicel (DA) 法及溴化去氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) 標定法，其 3 種方法的分類標準可知有無具潛在過敏性 (表五)，加上此方法目前對動物保護與動物減量的貢獻很大，各國管理單位廣為接受此新規範。

表四、眼及皮膚刺激性分類標準 (參考標準)

Table 4. Classification of acute eye and dermal irritation (reference standard)

Classification	Acute eye irritation ¹⁾	Acute dermal irritation ²⁾
Highly irritative	Effects on the cornea, iris or conjunctiva that are not expected to reverse or that have not fully reversed within 21 days.	PDII ³⁾ ≥ 4.0
Moderately irritative	Effects on the cornea, iris or conjunctiva that fully reverse within 8- 21 days	PDII $\geq 2.3 \sim < 4.0$
Slightly irritative	Effects on the cornea, iris or conjunctiva that fully reverse within 7 days.	PDII $> 0 \sim < 2.3$
Non-irritative	No effects	PDII = 0

¹⁾ Refer to USEPA toxicity classification standards.

²⁾ Refer to GHS toxicity classification standards.

³⁾ PDII: Primary dermal irritation index.

表五、過敏性分類標準 (參考標準) ¹⁾

Table 5. Classification of skin sensitization (reference standard) ¹⁾

Method for LLNA	Stimulation Index (SI)	
	Positive sensitization effect	Negative sensitization effect
Radioactive labelling method	SI ≥ 3	SI < 3
DA method	SI ≥ 1.8	SI < 1.8
BrdU labelling method	SI ≥ 1.6	SI < 1.6

¹⁾ Refer to OECD test guideline 429, 442A, and 442B.

DA: Daicel; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine.

另外，水生生物毒性試驗分為淡水魚類急毒性試驗與淡水無脊椎生物毒性試驗^(7, 8)，主要觀察淡水魚類 96 小時急性致死毒性 (LC₅₀) 與水蚤 48 小時急毒性 (median effective concentration, EC₅₀)，其毒性分類可分為劇毒、中等毒、輕毒及低毒等 4 個等級 (表六)。蜜蜂急毒性試驗包括蜜蜂成蟲口服急毒性試驗與蜜蜂成蟲接觸急毒性試驗，主要瞭解蜜蜂 48 小時之半數致死劑量 (LD₅₀)⁽⁸⁾，其毒性分類亦可分為劇毒、中等毒、輕毒及低毒等 4 個等級 (表七)。

毒理試驗之結果與成效探討

本研究計畫由農試所、臺中改良場、苗栗改良場、中興大學、宜蘭大學及藥毒所的研發產品中，共盤點 26 項天然植物保護資材產品，其中 4 項對水生生物毒性較強或製劑配方尚在研發階段等因素，未納入商品化運作，其餘 22 項產品依前章節「毒理試驗需求之判斷依據」原則視產品組成分安全性、產品劑型、防治對象及田間使用方法等，評估各產品所需之毒理

試驗項目要件，例如防治蜂蟹蟎之產品使用侷限於蜂箱內，較不會有人為吸入風險，原則是可免呼吸急毒性試驗，但若其產品之有效成分屬於易揮發物質，則需呼吸毒性試驗；又如防治茄子二點葉蟎之植物油混方因茄子非屬蜜源或粉源作物及防治番茄根瘤線蟲之肉桂油乳劑是直接土壤灌注使用，兩者皆可不需蜜蜂急毒性試驗資料，最後所有產品經盤點與評估後所需之毒理要件如表八所示，產品包括有防治柑橘類薊馬之 TK99 (代碼 0532 & 0653)、番茄晚疫病之中和亞磷酸製劑 (代碼 0543)、番茄根瘤線蟲之肉桂油乳劑 (代碼 0547)、十字花科蔬菜小菜蛾之坡縷石可濕性粉劑 (代碼 0563)、茄子二點葉蟎之植物油混方 (代碼 0726)、草莓炭疽病之五倍子萃取溶液 (代碼 0803)、胡瓜白粉病之乳化植物油製劑 (代碼 0544) 與甲殼素合劑 (代碼 0553)、小黃瓜蚜蟲之液體皂植保製劑 (代碼 0549)、蜂蟹蟎之草酸液劑 (代碼 0614)、百里酚蒸散劑 (代碼 0682) 及甲酸膠體 (代碼 0690) 等 12 項，其中第 1 至 6 項產品屬於天然素材類農藥產品，其次 7 至 9 項屬於公告之免登

表六、水生生物毒性分類標準 (我國公告標準)

Table 6. Classification of aquatic toxicity (Official pesticide toxicity classification in Taiwan)

Classification	Fish acute toxicity (96 h) LC ₅₀ (mg/L)	Daphnia sp. acute toxicity (48 h) EC ₅₀ (mg/L)
Highly toxic		≤ 1
Moderately toxic		> 1 ~ ≤ 10
Slightly toxic		> 10 ~ ≤ 100
Practically non-toxic		> 100

表七、蜜蜂急毒性分類標準 (參考標準)¹⁾Table 7. Classification of honey bee acute toxicity (reference standard)¹⁾

Classification	Honey bee acute oral toxicity LD ₅₀ (μg a.i./bee)	Honey bee acute contact toxicity LD ₅₀ (μg a.i./bee)
Highly toxic		< 1
Moderately toxic		≥ 1 ~ < 10
Slightly toxic		≥ 10 ~ < 100
Practically non-toxic		> 100

¹⁾ Refer to the international commission for bee botany (ICBB) (1985).

表八、計 22 項產品之毒理試驗需求

Table 8. Toxicological tests required for 22 natural pesticides

Test item ¹⁾	Toxicological test						
	Acute oral toxicity	Acute dermal toxicity	Acute inhalation toxicity	Acute eye irritation ²⁾	Skin sensitization	Honey bee acute oral toxicity	Honey bee acute contact toxicity
0532 & 0653	v			v	v	v	v
0543	v			v	v		
0547	v		v	v	v		
0563	v		v	v		v	v
0726	v			v	v		
0803	v			v	v	v	v
0544	v			v	v	v	v
0549	v			v	v	v	v
0553	v			v	v	v	v
0614	v	v		v	v	v	v
0682	v	v	v	v	v	v	v
0690	v	v		v	v	v	v

0574, 0585, 0645, 0631, 0632, 0697, 0698, 0808, 0768, 0807 are all pheromone products and due to the low risk to human and animals, it is not required to perform toxicological testing under current pesticide regulation.

¹⁾ The test item 0532 & 0653 (TK99 SC), 0543 (neutralized phosphorous acid), 0547 (cinnamon oil emulsion), 0563 (palygorskite wettable powder), 0726 (plant oil mixture), 0803 (galla nut Chinese herbal solution), 0544 (emulsified sunflower oil), 0549 (liquid soap plant protectant), 0553 (chitin SL), 0614 (oxalic acid SL), 0682 (thymol VP), 0690 (formic acid gel), 0574 (*Plutella xylostella*), 0585 (*Cydia notanthus*), 0645 (*Cylas formicarius*), 0631 (*Spodoptera litura*), 0632 (*Spodoptera exigua*), 0697 (*doxophyes* sp.), 0698 (*Helicoverpa armigera*), 0808 (*Grapholita molesta*), 0768 (*Cydia notanthus*), 0807 (Thrip alarm pheromone).

²⁾ The acute dermal irritation test is conducted when results of acute eye irritation testing indicate that a product is moderate or serious irritant.

記植物保護資材清單產品，再其次 3 項屬於有機化學農藥之化工原料類產品。表八最後有 10 項產品屬於生化農藥中之費洛蒙類，包括小菜蛾（代碼 0574）、花姬捲葉蛾（代碼 0585）、甘藷蟻象（代碼 0645）、斜紋夜蛾（代碼 0631）、甜菜夜蛾（代碼 0632）、茶姬捲葉蛾（代碼 0697 & 0768 等 2 項）、番茄夜蛾（代碼 0698）、粗腳姬捲葉蛾/桃折心蟲（代碼 0808）等性費洛蒙及薊馬警戒費洛蒙（代碼 0807）等，經毒理平臺評估確認甘藷蟻象性費洛蒙原體屬鞘翅目費洛蒙，薊馬警戒費洛蒙原體屬縷翅目費洛蒙，其餘 8 項產品原體均屬於特性明確的 SCLPs 同一化學結構群（屬於低急性毒性與刺激性），且成品使用時，全部費洛蒙類產品均定置於釋放裝置內而未直接接觸作物，因此評估預期對人類健康無明顯的風險性，可免毒理試驗要件。

本研究主要針對需進行毒理試驗之 12 項產品製備其所需之毒理試驗資料，期間並依試驗結果視情況增加額外的試驗，如眼刺激性結果為中度刺激以上者，則會加做皮膚刺激性試驗，該 12 項產品之各項毒理試驗結果與其毒性分類如表九所示，後續進一步依各產品的細項毒理試驗結果做毒性、刺激程度與過敏性強弱之比較。

在口服急毒性試驗方面，計 12 項產品中有 9 項之口服急毒性 LD_{50} 值均 $> 5,000$ mg/kg，屬於低毒等級，其餘 3 項屬於輕毒等級， LD_{50} 值分別為 5,000、3,983

及 3,100 mg/kg，其安全性依代碼順序為 0614 $>$ 0682 $>$ 0690。皮膚急毒性試驗方面，經評估後有 4 項產品需進行動物試驗，包括 0547、0614、0682 及 0690，結果 4 項產品皮膚急毒性 LD_{50} 值均 $> 5,000$ mg/kg，屬於低毒等級。另有 3 項產品（0547、0563 及 0682）需進行呼吸急毒性試驗，毒性等級均為輕毒，其呼吸急毒性 LC_{50} 值依序為 > 2.246 、 > 4.748 及 > 3.286 mg/L（表九）。

眼刺激性試驗主要觀察白兔眼睛角膜、虹彩及結膜之刺激症狀反應，結果有 7 項產品（0543、0544、0553、0563、0653、0726 及 0803 等）之眼刺激性反應在 7 天內恢復，屬於輕微眼刺激性等級，3 項產品（0547、0614 及 0682）在第 21 天仍具刺激性症狀，屬於嚴重眼刺激性等級；另外 0549 產品因屬強鹼性（pH 值 > 11.5 ），及 0690 產品由小鼠皮膚過敏性試驗顯示對皮膚具強烈刺激性與腐蝕性，考量動物福祉，直接判定其具腐蝕性，標示具嚴重眼與皮膚刺激性，不進行動物試驗（表九）。另一方面，為比較各產品的眼刺激性強弱等級，將眼刺激性試驗的 10 項產品所觀察之刺激症狀，參照 Draize 等人發表之方法⁽¹⁰⁾ 除省略結膜分泌物程度分數外，依公式計算每項產品在每個觀察時間點的眼刺激性指數，原則上統計後之數值愈高代表刺激程度愈強，結果顯示眼刺激性強弱程度依序為 0547 $>$ 0614 $>$ 0682 $>$ 0803 $>$ 0563 $>$ 0553 $>$ 0726 $>$ 0543 $>$ 0544 $>$ 0653（表十）。由於眼刺激性試驗

表九、計 12 項產品之毒理試驗結果與毒性分類

Table 9. Results of toxicity testing and toxicity classification for 12 natural pesticides

Test item	Test results	Classification
0532 & 0653	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Positive ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0543	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, $LD_{50} > 200$ µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Negative ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0547	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Acute dermal toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg¹) ● Acute inhalation toxicity, $LC_{50} > 2.246$ mg/L ● Eye irritation ● Dermal irritation ● Skin sensitization	● Practically non-toxic ● Practically non-toxic ● Slightly ● Highly ● Moderately ● Positive
0563	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Acute inhalation toxicity, $LC_{50} > 4.748$ mg/L ● Eye irritation ● Honey bee acute oral toxicity, $LD_{50} > 216$ µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, $LD_{50} > 108$ µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Slightly ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0726	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization	● Practically non-toxic ● Slightly ● Positive
0803	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Positive ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0544	● Acute oral toxicity, $LD_{50} > 5,000$ mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, $LD_{50} > 100$ µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Positive ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic

(Continued on the next page)

表九 (續)、計 12 項產品之毒理試驗結果與毒性分類

Table 9 (continued). Results of toxicity testing and toxicity classification for 12 natural pesticides

Test item	Test results	Classification
0549	● Acute oral toxicity, LD₅₀ > 5,000 mg/kg ● Eye irritation²⁾ ● Dermal irritation²⁾ ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, LD₅₀ > 100 µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, LD₅₀ > 100 µg/bee	● Practically non-toxic ● Highly ● Highly ● Negative ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0553	● Acute oral toxicity, LD₅₀ > 5,000 mg/kg ● Eye irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, LD₅₀ > 100 µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, LD₅₀ > 16 µg/bee	● Practically non-toxic ● Slightly ● Negative ● Practically non-toxic ● Slightly
0614	● Acute oral toxicity, LD₅₀ 5,000 mg/kg ● Acute dermal toxicity, LD₅₀ > 5,000 mg/kg ● Eye irritation ● Dermal irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, LD₅₀ > 107 µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, LD₅₀ > 107 µg/bee	● Slightly ● Practically non-toxic ● Highly ● Slightly ● Negative ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic
0682	● Acute oral toxicity, LD₅₀ 3,983 mg/kg ● Acute dermal toxicity, LD₅₀ > 5,000 mg/kg ● Acute inhalation toxicity, LC₅₀ > 3.286 mg/L ● Eye irritation ● Dermal irritation ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, LD₅₀ 78.7 µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, LD₅₀ 172.4 µg/bee	● Slightly ● Practically non-toxic ● Slightly ● Highly ● Moderately ● Positive ● Slightly ● Practically non-toxic
0690	● Acute oral toxicity, LD₅₀ 3,100 mg/kg ● Acute dermal toxicity, LD₅₀ > 5,000 mg/kg ● Eye irritation³⁾ ● Dermal irritation³⁾ ● Skin sensitization ● Honey bee acute oral toxicity, LD₅₀ > 106.8 µg/bee ● Honey bee acute contact toxicity, LD₅₀ > 116.7 µg/bee	● Slightly ● Practically non-toxic ● Highly ● Highly ● Positive ● Practically non-toxic ● Practically non-toxic

¹⁾ Results were from a summary report, not GLP report.²⁾ The pH value of the test item was higher than 11.5; therefore, the test result was immediately labeled as “highly irritative / corrosive”.³⁾ Corrosive damage was observed in mice during the skin sensitization test; therefore, the test result was directly labeled as “highly irritative / corrosive”.

結果達中度刺激以上者，需繳交皮膚刺激性試驗報告，由表九可知 0549 因 pH 大於 11.5 及 0690 因小鼠皮膚過敏試驗出現腐蝕性傷害，逕予判定為嚴重皮膚刺激性外，尚有 3 項產品 (0547、0614 及 0682) 需再進行白兔皮膚刺激性試驗，試驗主要觀察動物皮膚紅斑與水腫程度，並利用

Draize 方法⁽¹⁰⁾ 計算產品在每個觀察時間點之皮膚刺激性指數 (表十一)，結果各產品指數最高依序為 3.7 (第 1 小時)、0.7 (第 1 小時) 及 2.3 (第 48 小時至第 7 天)，其皮膚刺激性強弱等級為 0547 (中度) > 0682 (中度) > 0614 (輕微)。

表十、白兔經強迫眼睛接觸試驗物後之眼刺激指數

Table 10. Eye irritation test index scores of rabbits treated with different natural pesticides

Test item	Irritation index (PII) ¹⁾						
	1 h	24 h	48 h	72 h	7 d	14 d	21 d
0543	9.0	3.7	0.0	0.0	ND ²⁾	ND	ND
0544	9.0	2.0	0.0	0.0	ND	ND	ND
0547	16.3	57.7	78.3	77.7	86.6	98.3	- ³⁾
0553	12.3	9.7	2.7	1.3	0.0	0.0	0.0
0563	13.7	25.3	20.3	9.0	0.0	0.0	0.0
0614	56.8	103.3	79.1	72.6	77.7	76.1	41.7
0653	2.0	2.0	0.0	0.0	ND	ND	ND
0682	27.7	47.0	37.0	47.0	45.1	40.3	27.5
0726	4.0	4.0	0.7	0.0	ND	ND	ND
0803	40.0	23.4	9.9	9.2	0.0	0.0	0.0

¹⁾ Primary eye irritation index (PII) values were calculated using the modified Draize method (n = 3). PII = cornea irritation index + iris irritation index + conjunctiva irritation index.

²⁾ “ND” indicates that the test had already been completed; therefore, so no data were collected.

³⁾ “-” indicates that animals suffered irreversible damage and were therefore euthanized prior to the test date.

表十一、白兔經強迫皮膚接觸試驗物後之皮膚刺激指數

Table 11. Dermal irritation test index scores of rabbits treated with different natural pesticides

Test item	Irritation index (PDII) ¹⁾					
	1 h	24 h	48 h	72 h	7 d	14 d
0547	3.7	3.0	3.0	3.0	1.0	1.0
0614	0.7	0.3	0.0	0.0	ND ²⁾	ND
0682	1.3	2.0	2.3	2.3	2.3	0.7

¹⁾ Primary dermal irritation index (PDII) values were calculated using Draize method (n = 3).

PDII = erythema or eschar index + edema index.

²⁾ “ND” indicates that the test had already been completed; therefore, so no data were collected.

皮膚過敏性試驗，採用小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法之 BrdU 標定法，其陽性判定標準為皮膚刺激指數 (SI 值) ≥ 1.6 (3, 8)。由表九可知有 11 項產品進行皮膚過敏試驗，結果顯示其中 7 項產品 (0544、0547、0653、0682、0690、0726 及 0803) 具潛在皮膚過敏性，其餘 4 項產品 (0543、0549、0553 及 0614) 則不具皮膚過敏性。進一步將具過敏性產品之 3 個濃度劑量下所得的 SI 值摘錄如表十二所示，依產品 SI 值高低與是否有劑量反應關係等，判定過敏性強弱為 $0726 > 0690 > 0682 > 0544 > 0547 > 0803 \approx 0653$ 。在非目標生物毒性試驗方面，有 7 項產品 (0653、0543、0563、0803、0544、0549 及 0553) 因施用在蜜源或粉源作物 (其中 0543 產品為未來擴大使用之範圍作物) 及 3 項產品 (0614、0682 及 0690) 可能影響蜜蜂 (防治蜂蟹蟎)，均進行蜜蜂口服急

毒性與接觸急毒性試驗。結果由表九可知，10 項產品中除 0553 之蜜蜂接觸急毒性及 0682 之蜜蜂口服急毒性屬於輕毒等級外，大部份產品之蜜蜂口服急毒性與接觸急毒性均屬於低毒等級 ($LD_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{bee}$)。

綜合以上資料可知，藉由毒理試驗平臺完成 22 項產品之動物毒理安全性評估，共出具 62 份毒理試驗報告，並透過跨機關跨領域之平臺團隊合作，截至 2017 年 12 月底已有 6 項產品完成技轉，其中 1 項已完成免登記植物保護資材登錄，1 項完成農藥登記，2 項進入農藥登記審查流程，另外亦有 6 項產品進入產品技轉媒合中。因此，天然植物保護資材產品透過 2014 至 2017 年計畫支持與平臺輔導交流，已成功的建立高安全性天然植物保護資材登記及商品化典範。

表十二、小鼠經不同試驗物引發後各 3 個劑量組之 SI 值

Table 12. Stimulation index values of mice treated with different natural pesticides at three dose levels following skin sensitization

Test item	Stimulation index (SI) ¹⁾ / Dose level (%)		
	Low dose	Medium dose	High dose
0544	1.7 / 5%	3.0 / 10%	9.1 / 25%
0547	1.1 / 5%	1.9 / 10%	3.3 / 25%
0653	3.3 / 100%	ND ²⁾	ND
0682	3.1 / 10%	4.7 / 25%	5.9 / 50%
0690	1.9 / 2.5%	3.0 / 5%	5.4 / 10%
0726	4.9 / 2.5%	6.3 / 5%	8.4 / 10%
0803	1.4 / 10%	1.5 / 25%	2.1 / 50%

¹⁾ SI values = BrdU labelling index of treatment group $\div$ BrdU labelling index of solvent control (n = 5).

²⁾ “ND” indicates that no test was performed; therefore, no data were collected.

結語

本研究計畫，成功盤點出 22 項產品，陸續以商品化的角度補足其關鍵缺口，計畫執行期間全部產品已完成毒理試驗項目需求之評估與完成毒理試驗資料之製備，結果顯示經安全測試與評估後，這些產品均屬於較安全的天然資材產品，其口服急毒性等級均介於輕毒至低毒，惟部分產品如 TK99 SC、乳化植物油製劑、五倍子萃取溶液、肉桂油乳劑、液體皂植保製劑、植物油混方、草酸液劑、百里酚蒸散劑及甲酸膠體等 9 項產品刺激性較強或具潛在過敏性，施用時需戴護目鏡與手套，並需在產品包裝上加註警語。綜觀上述產品取得登記上市後，可提高生物農藥市場的選擇性與多樣性，進而促進有機農業發展，加上本平臺出具符合國際認可的 GLP 規範毒理試驗報告，可拓展產品進軍國際市場。未來仍可持續藉由此商品化技術平臺運作，強化盤點程序，確保具有穩定製程、明確指標成分及初步藥效試驗的研發產品進入平臺，同時強化研發者與技術專家雙方溝通，必要時可再對研發人員進行教育訓練，使新進研發人員能夠瞭解農藥登記所需相關資料與程序，以加速各類生物農藥上市及取代化學性農藥，達成化學農藥減量、安全使用優質農產品及商品國際化之最終目的。

謝辭

本研究承行政院農業委員會 103 農科-10.2.4-藥-P1 (2)、104 農科-10.9.1-藥-P1 (2)、105 農科-10.8.1-藥-P1 (3) 及 106 農科-9.7.1-藥-P1 (2) 計畫經費補助。試驗期間承洪佳雯、彭明霞及黃綺雅小姐等協助完成各項急毒性試驗，蔡寶隆博士協助英文翻譯校對，以利順利發表，謹此致謝。

引用文獻

1. 王清玲。2010。貳、精油類。作物蟲害非農藥防治資材(農試所特刊第 142 號)，第 52-55 頁。王清玲主編。行政院農業委員會農業試驗所印。臺中。
2. 行政院農業委員會。2013。農藥管理法—農藥理化性及毒理試驗準則。行政院農業委員會農防字第 1021487724 號令。
3. 李彥芸、張敬宜、蔡韙任、吳偉嘉。2016。國際毒理測試趨勢：體外微核試驗及口服急毒性與皮膚過敏性動物減量試驗。臺灣農藥科學 1: 195-205。
4. 林立、楊大吉。2010。參、植物浸液。作物蟲害非農藥防治資材(農試所特刊第 142 號)，第 56-59 頁。王清玲主編。行政院農業委員會農業試驗所印。臺中。
5. 洪佳雯、陳筱青、蔡韙任。2014。呼吸暴露之毒理測試方法及應用評估概述。藥毒所專題報導 114: 1-11。
6. 費雯綺、張敬宜、蔡韙任、何明勳。2017。推動天然植物保護資材商品化之效益與展望。106 年天然植物保護資材

- 商品化研發成果及應用研討會專刊，第 2-12 頁。張敬宜、黃郁容、蔡韋任、謝奉家、何明勳、費雯綺編。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所印。臺中。
7. 農業藥物毒物試驗所。2014。農藥登記之毒理試驗報告內容要求指引。1 版。取自 <https://www.tactri.gov.tw/Uploads/Item/f6015544-a87b-4fef-b2eb-9d56b613cbe3.pdf>。
 8. 蔡韋任、張敬宜。2017。天然植物保護資材商品化平台—毒理試驗。106 年天然植物保護資材商品化研發成果及應用研討會專刊，第 25-36 頁。張敬宜、黃郁容、蔡韋任、謝奉家、何明勳、費雯綺 編。行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所印。臺中。
 9. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2018. Guideline for the registration of biological agricultural products. Available at <https://apvma.gov.au/node/11196>.
 10. Draize, J. H., Woodard, G., and Calvery, H. O. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 83: 377-390.
 11. European Commission. 2014. Guidance document on botanical active substances used in plant production products. Document number SANCO/11470/2012.
 12. European Commission. 2017. Commission Regulation (EU) 2017/1432 of 7 August 2017 amending Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and the Council concerning the placing of plant protection products on the market as regards the criteria for the approval of low-risk active substances. Available at <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/1432/oj>
 13. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 1998. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. No. 1-OECD Principles on good laboratory practice OECD, Paris, France. 41 pp.
 14. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Available at <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects> 20745788.
 15. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). OECD work on biology pesticides. Available at <http://www.oecd.org/chemicalsafety/pesticides-biocides/biological-pesticides.htm>.
 16. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). 2002. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (OCSPP), Test guidelines for pesticides and toxic substances, Series 870- Health effects test guidelines. Available at <https://www.epa>.

- gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-870-health-effects-test-guidelines.
17. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). 2009. Biochemical pesticides human health assessment data requirements table. 40 CFR. 158.2050. Available at <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2009-title40-vol23/pdf/CFR-2009-title40-vol23-sec158-2050.pdf>
18. U. S. Environmental Protection Agency (EPA). 2009. Biochemical pesticides nontarget organisms and environmental fate data requirements table. 40 CFR. 158.2060.

Performance Report on a Commercialized Platform for the Development and Toxicological Study of Natural Pesticides

Jin-Yi Chang^{1*}, Yi-Jing Chuang¹, Shao-Jung Lo¹, Wei-Jia Wu¹, Tzay-Tien Hsieh¹, Wei-Ren Tsai¹

Abstract

Chang, J. Y., Chuang, Y. J., Lo, S. J., Wu, W. J., Hsieh, T. T., and Tsai, W. R. 2018. Performance report on a commercialized platform for the development and toxicological study of natural pesticides. *Taiwan Pestic. Sci.* 4:1-19.

Natural pesticides are considered to be safe to humans, other animals, and the surrounding environment. A multidisciplinary team of research specialists (including area of toxicology, veterinary, and biology) was organized by TACTRI to fill research gaps related to key techniques and to help overcome the legal obstacles to product registration. The overall goal of this work was to establish a commercial platform to collect natural pesticides (explored by District Agricultural Research and Extension Station, universities and colleges), and to prepare toxicological data requirements for registration in order to facilitate technology transfer and product launch. The objectives of the project included: 1. Collect international requirements for the registration of biopesticide products; 2. propose related guidelines for toxicity classification and for the testing of acute toxicity and toxicity in non-target organisms; and 3. conduct the required toxicological studies and prepare study reports. Specifically, 26 natural pesticides were selected for this project, and toxicological studies (which included 62 GLP study reports) were completed for 22 of them. Our results revealed that the acute oral toxicity of all 22 tested products fell under the category “slightly to practically non-toxic”; therefore, all these products can be considered safe.

Accepted: September 4, 2018.

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

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

However, 9 products, including TK99 SC, emulsified sunflower oil, galla nut Chinese herbal solution, cinnamon oil emulsion, liquid soap plant protectant, plant oil mixture, oxalic acid SL, thymol VP, and formic acid gel, did lead symptoms of strong irritation or skin sensitization; therefore, the labels of these products should include proper warnings, such as the need to wear protective goggles and gloves when applying. Overall, the commercial platform established through this project successfully addressed challenges of getting safe, natural pesticides on the market in a shorter time, including the screening of potential products, safety evaluations of products, and preparation of registration documents. As a result, this platform can produce greater product diversity in the market and improve the development of organic farming while conforming to international market trends through the use of recognized toxicological GLP study reports. In the future, the commercial platform should focus on speeding up market availability of natural biopesticides so that these products can help reduce the use of chemical pesticides, increase the safety of agricultural products, and good enough for international market.

Key words: natural pesticides, commercial platform, toxicological study, GLP test guidelines, toxicity classification.