

中华人民共和国国家标准

农药登记毒理学试验方法

GB 15670—1995

Toxicological test methods of
pesticides for registration

1 主题内容与适用范围

本标准规定了农药登记毒理学试验的方法、条件的基本要求。

本标准适用于为农药登记而进行的毒理学试验。

2 急性经口毒性试验

2.1 目的

求出试验农药对试验动物的半数致死剂量(LD₅₀)；通过观察急性毒性效应的临床表现，初步估测毒作用的靶器官和可能的毒作用机理；为亚慢性、慢性和其他毒性试验的剂量水平设计提供参考；为急性毒性分级和制定安全防护措施提供依据。

2.2 试验农药

原药和制剂。

2.3 试验动物

2.3.1 主要选用品系、遗传背景明确的初成年大鼠。各剂量组内同性别动物体重差异应小于平均体重的10%，组间同性别动物体重均值差异应小于5%。

2.3.2 每一剂量组的大鼠8~10只(雌雄各半)，试验前要对动物观察一周，确认健康后，方可使用。

2.4 剂量分组

2.4.1 至少应设4~5个剂量组，各剂量组之间要有适当的剂量间距。以便各组出现不同程度的毒性效应(死亡率)，求得剂量效应曲线及LD₅₀。

2.4.2 如剂量达5 000 mg/kg体重以上，动物仍不出现死亡，则不需要进行更高剂量的试验。

2.5 给药方法及观察时间

2.5.1 动物给药前应隔夜禁食但不禁水，称重后，一次灌胃给药，给药后至少间隔2 h进食。

2.5.2 灌胃量

大鼠按100 g体重给1 mL，小鼠按20 g体重给0.4 mL计算，灌胃可用水溶液、油溶液或悬液。

2.5.3 给药后立即观察并记录动物的中毒表现，症状出现和消失的时间及死亡时间。给药当日应连续观察，其后，每日至少观察2次，观察期为14 d。如在给药96 h后出现迟发性新效应，则应延长观察期至3周或4周。

2.6 观察指标

2.6.1 中毒症状

全面观察中毒的发生、发展过程和规律以及中毒特点和毒作用的靶器官。观察的系统包括：

a. 中枢神经系统和神经肌肉系统：体位异常、叫声异常、不安、呆滞、痉挛、抽搐麻痹、运动失调、对外反应过敏或迟钝；

国家技术监督局1995-08-17批准

1996-01-01实施

- b. 植物神经系统:瞳孔扩大或缩小、流涎或流泪;
- c. 呼吸系统:鼻孔流液、鼻翼煽动、呼吸深缓、呼吸过速、蜂腰;
- d. 泌尿生殖系统:会阴部污秽、有分泌物、阴道或乳房肿胀;
- e. 皮肤和毛:皮肤充血、紫绀、被毛蓬松、污秽;
- f. 眼:眼球突出、结膜充血、角膜混浊;
- g. 消化系统:腹泄、厌食。

2.6.2 体重

给药前、死亡时各称量一次体重,观察期间每3d称量一次。

2.6.3 一般不做病理组织学检查和生化指标检验,但对死亡动物应做大体病理学观察。如24h以上的存活动物,肉眼检查有病变时应做病理组织学检查。

2.7 结果评定

2.7.1 用统计方法计算 LD_{50} 值。计算方法见附录A(补充件)。

2.7.2 按农药的急性经口毒性分级标准进行评定(见表1)。

表1 急性经口毒性分级标准

级 别	经口 LD_{50} , mg/kg
剧 毒	<5
高 毒	5~50
中 毒	50~500
低 毒	>500

3 急性经皮毒性试验

3.1 目的

了解农药对试验动物皮肤直接接触引起局部皮肤损伤、全身中毒的特征等毒性效应,求出半数致死剂量(LD_{50}),为制定农药生产和应用中的防护措施提供依据。

3.2 试验农药

原药和制剂。

3.3 试验动物

3.3.1 为有足够的涂药面积,首选成年大鼠,体重要求200~300g。

3.3.2 各剂量组大鼠8~10只(雌雄各半)。

3.4 剂量分组

3.4.1 至少应设4个剂量组,各剂量组应有一定的间距,使给药组能出现毒性表现和死亡。

3.4.2 如果2000mg/kg剂量仍不出现死亡时,则不需要再进行高剂量试验。

3.5 给药方法及观察时间

3.5.1 给药前24h背部去毛,注意勿损伤皮肤,涂药面积应占体表面积10%,大鼠 $4 \times 5 \text{ cm}^2$,兔 $12 \times 14 \text{ cm}^2$,豚鼠 $7 \times 10 \text{ cm}^2$ 。

3.5.2 液体农药用原药液,粉末农药用水或溶剂稀释。

3.5.3 先将动物固定,在略小于剃毛面积内进行定量敷药,然后覆盖一个与脱毛面积相当的盒式罩,再用胶布固定。以防止动物舔食试验药品。

3.5.4 涂药持续时间为4h。

3.5.5 涂药4h后取下罩盒,用温水洗去皮肤上的试验农药,再进行局部观察。

3.5.6 观察时间为2周。

3.6 观察指标

3.6.1 中毒的临床表现,参照 2.6.1。

3.6.2 死亡时间及死亡率。

3.7 结果评定

3.7.1 用统计方法计算 LD_{50} 值。计算方法见附录 A(补充件)。

3.7.2 按农药的急性经皮毒性分级标准进行评定(见表 2)。

表 2 急性经皮毒性分级标准

级 别	经皮 LD_{50} (4 h), mg/kg
剧 毒	<20
高 毒	20~200
中 毒	200~2 000
低 毒	>2 000

4 急性吸入毒性试验

4.1 目的

测试可能经呼吸道进入机体的农药(尤其是挥发性强的农药)对呼吸道及全身的损伤及其危害程度。求出吸入接触的半数致死浓度(LC_{50}),为农药的安全评价和制定生产应用中的防护措施提供依据。

4.2 试验农药

原药和制剂。

4.3 试验动物

4.3.1 一种以上的哺乳动物,大鼠为首选动物。

4.3.2 动物性别、体重和每组动物数量的要求同 2.3。

4.4 剂量分组

4.4.1 至少应设 3 个出现毒性效应直至死亡的剂量组。

4.4.2 如果以浓度 2 000 mg/m³ 给药 2 h 仍无死亡,则无需再做高浓度试验。

4.5 给药方法及观察时间

4.5.1 给药方式包括鼻、头部接触和全身置于染毒柜内接触两种方式。

4.5.2 染毒柜内应保持恒定的空气流量、农药浓度、温度及湿度,并要求柜内保持轻微负压以免农药外漏。

4.5.3 吸入给药一般为 2 h。

4.5.4 给药后至少观察 14 d。

4.6 观察指标

4.6.1 中毒的临床表现,参照 2.6.1。

4.6.2 死亡时间及死亡率。

4.7 结果评定

4.7.1 用统计方法计算 LC_{50} 值。计算方法见附录 A(补充件)。

4.7.2 按农药的急性吸入毒性分级标准进行评定(见表 3)。

表 3 急性吸入毒性分级标准

级 别	LC_{50} (2 h), mg/m ³
剧 毒	<20
高 毒	20~200
中 毒	200~2 000
低 毒	>2 000

5 急性皮肤刺激试验

5.1 目的

测定农药对哺乳动物皮肤是否有刺激或腐蚀作用,估计人体接触该农药时可能出现的类似危害。

5.2 试验农药

原药和制剂。

5.3 试验动物

5.3.1 兔或豚鼠,首选动物为白色家兔。

5.3.2 至少4只皮肤完好的健康动物。

5.4 剂量

5.4.1 一次涂药量为0.5 mL或0.5 g。

5.4.2 动物自身皮肤做为对照。

5.5 试验步骤

5.5.1 试验前24 h将背部毛剪掉,面积约6 cm²。

5.5.2 涂上试验农药,再用纱布盖上,以胶布固定或采用其他封闭性盖罩,避免试验动物舔食。

5.5.3 涂敷持续时间一般为4 h。试验结束时,用水或适当的溶剂洗去残留的农药,但注意不要损伤皮肤。

5.5.4 根据需要做进一步的观察,以确定反应的可逆性。一般观察期不超过14 d。

5.6 结果评定

每一只动物试验结果按表4进行刺激反应评分,计算出平均分,按表5进行强度评定。

表4 皮肤刺激反应评分

症 状 及 程 度	积 分
A 红斑形成	
无红斑	0
勉强可见	1
明显红斑	2
中等至严重红斑	3
紫红色斑并有焦痂形成	4
B 水肿形成	
无水肿	0
勉强可见	1
水肿隆起轮廓清楚	2
水肿隆起约1 mm	3
水肿隆起超过1 mm,范围扩大	4
总分	A+B

表 5 皮肤刺激强度分级

强 度	分 值
无刺激性	0~0.4
轻度刺激性	0.5~1.9
中等刺激性	2.0~5.9
强刺激性	6.0~8.0

注：pH≤2 或 pH≥11.5 的农药可不进行本试验。

6 眼刺激试验

6.1 目的

了解试验农药对眼睛的刺激作用和程度，为农药生产和使用中的安全防护提供依据。

6.2 试验农药

原药和制剂，但对具有强酸、强碱性质的化合物(pH≤2, pH≥11.5)不需做此试验。

6.3 试验动物

成年的白色家兔至少 4 只。试验前 24 h 检查试验家兔双眼，有异常者不得使用。

6.4 剂量

液体农药或 100 倍稀释液 0.1 mL，粒状农药不超过 100 mg，且应先将颗粒磨成细粉。

6.5 给药方法及观察时间

6.5.1 将一侧下眼睑轻轻下拉，把试验农药滴入结膜囊内，为防止药液外溢，立即轻轻闭合眼睑约 1 min。如用喷雾给药法，将眼睑分开，在眼前方 10 cm 距离处迅速喷雾 1 s。

6.5.2 给药后 24 h 内不洗眼。

6.5.3 对侧眼为对照。

6.5.4 给药后于 1, 24, 48, 72 h 分别检查眼睛。如 72 h 仍无刺激反应时，则终止试验。

6.5.5 如果出现角膜损伤或眼睛其他部位出现反应，要继续观察损伤的经过及其可逆性，观察期最长不超过 21 d。

6.5.6 72 h 刺激反应仍不消退时，至少另选 4 只家兔观察洗眼效果。即滴入药物后分别在 4 s 和 30 s 时用生理盐水洗眼 5 min，观察洗眼后的眼睛反应情况。

6.6 观察指标

除了观察结膜、角膜、虹膜外，还应注意其他部位的损害。

6.7 结果评定

按表 6 将每只动物的角膜、虹膜和结膜的刺激反应的分值相加，即是一只动物眼刺激反应的总积分。每个动物的刺激反应积分的总和除以动物数，就是该试验农药对眼刺激性的最后分值。再按表 7 评定眼刺激程度。

表 6 眼损伤程度评分

部 位 及 程 度	积 分
角膜	
A 混浊(以最致密部位为准)	
无混浊	0
散在或弥漫性混浊，虹膜清晰可见	1

续表 6

部 位 及 程 度	积 分
半透明区易分辨,虹膜模糊不清	2
出现灰白色半透明区,虹膜细节不清,瞳孔大小勉强看清	3
角膜不透明,由于混浊,虹膜无法辨认	4
B 角膜受损范围	
$<1/4$	1
$1/4 \sim 1/2$	2
$1/2 \sim 3/4$	3
$3/4 \sim 1$	4
最高积分	80(积分 A $\times$ B $\times$ 5)
虹膜	
正常	0
皱折明显加深,充血,肿胀,角膜周围有轻度充血,瞳孔对光仍有反应	1
出血,肉眼可见破坏,对光无反应(或出现其中之一反应)	2
最高积分	10(积分 $\times$ 5)
结膜	
A 充血状态(系指睑结膜、球结膜部位的血管)	
血管正常充血	0
血管充血呈鲜红色	1
血管充血呈深红色,血管不易分辨	2
弥漫性充血呈紫红色	3
B 水肿	
无	0
轻微水肿(包括瞬膜)	1
明显水肿,伴有部分眼睑外翻	2
水肿至眼睑近半闭合	3
水肿至眼睑超过半闭合	4
C 分泌物	
无	0
少量	1
分泌物使眼睑和睫毛潮湿或粘着	2
分泌物使整个眼区潮湿或粘着	3
最高积分	20[(A+B+C) $\times$ 2]
角膜、虹膜、结膜反应累加最高积分	110(80+10+20)

表 7 眼刺激性分级

刺激强度	眼刺激积分指数 (I. A. O. I.)	眼刺激的平均指数 (M. I. O. I.)
无刺激性	0~5	48 h 后为 0
轻度刺激性	5~15	48 h 后小于 5
轻度至中度刺激性	15~30	4 d 后小于 5
中度刺激性	30~60	7 d 后小于 20
中度至重度刺激性	60~80	7 d 后小于 40
重度刺激性	80~110	

7 皮肤变态反应(致敏)试验

7.1 目的

测试动物在反复接触农药后,机体产生免疫传递的皮肤反应的可能性,从而确定农药的变态反应性(致敏)。

7.2 试验农药

制剂。

7.3 试验动物

豚鼠,每组动物数 10~20 只。

7.4 剂量

致敏(诱导)浓度允许引起皮肤轻度刺激反应(即最高耐受浓度)。激发浓度一般应低于致敏浓度,不得引起原发性刺激性炎症反应。

7.5 试验步骤

7.5.1 接触致敏的发病过程包括致敏和激发两个阶段。

a. 致敏接触

实验前 24 h 将动物背部左侧去毛 3 cm×3 cm。将试验农药 0.1~0.2 mL 涂在 2 cm×2 cm 滤纸上,并将其敷贴在去毛区,用两层纱布,一层油纸或不透水塑料膜覆盖,再以无刺激胶布封闭固定,持续 6 h。第 7 d 和第 14 d 以同样方法重复一次。

b. 激发接触

实验前 24 h 将动物背部右侧去毛 2 cm×2 cm。末次致敏后 14~28 d,将 0.1~0.2 mL 或低于诱导浓度的试验农药斑贴于右侧去毛区,覆盖方法同 7.5.1 a. 持续 6 h,去掉斑贴及试验农药后,每日观察至第 12 d。如无致变,可再次激发以确定试验农药能否引起过敏反应。

7.5.2 试验须设阳性或阴性对照组。阴性对照组仅给予激发接触。

7.6 结果评定

将出现皮肤红斑或水肿(不论程度轻重)的动物数除以动物总数,求出动物致敏率,再按表 8 进行致敏率强度评定。

表 8 致敏率强度分级

致敏率	分 级	强度分类
0~8	I	弱致敏物
9~28	II	轻度致敏物

续表 8

致敏率	分 级	强度分类
29~64	Ⅲ	中度致敏物
65~80	Ⅳ	强度致敏物
81~100	Ⅴ	极强度致敏物

8 亚急性经口毒性试验

8.1 目的

通过经口途径在 1~4 周的时期内,连续多次给予不同剂量的试验农药,观察因试验农药的蓄积作用所产生的不良反应,确定亚急性无作用剂量和靶器官,并为亚慢性或慢性毒性试验的剂量设定提供依据。

8.2 试验农药

原药。

8.3 试验动物

8.3.1 首选大鼠。作为长期试验的预试验时,两种试验应使用同一种属和品系的动物。

8.3.2 选用大鼠的年龄一般为 6~8 周,体重变异应不大于平均体重的 10%。

8.3.3 每剂量组至少 10 只动物,雌雄各半。若试验过程中需要提前剖杀一些动物检查,或需要一个观察毒性反应可逆性的附加组时,则在试验开始时要作相应的增加。

8.4 剂量分组

一般设三个剂量组和一个对照组。根据类似化合物的资料,预计经口给药剂量超过 1 000 mg/kg 不会产生毒性时,可设二个剂量组。

8.4.1 高剂量组应使动物产生较明显的毒性效应。

8.4.2 中剂量组应产生轻微的可观察到的毒性效应。

8.4.3 低剂量组不应出现任何毒性效应,但须超过人的可能接触剂量。

8.4.4 对照组除了不接触试验农药外,其他处理均应与试验组完全相同。

8.5 给药方法

将试验农药掺入饲料或溶于饮水中,以固定浓度喂养或按动物体重以固定剂量通过胃管灌胃。作为长期毒性试验的预备试验时,两种试验应采用相同的给药方式。喂养给药应连续进行。管饲法每天在同一时间给药,并按一定的间隔时间(每周),根据体重调整给药量。

8.6 给药时间

连续给药 7~28 d 或 5 d/周。为了观察毒性反应的可逆性,附加组动物在停止给药后再饲养 14 d,再进行毒性效应的测试。

8.7 临床观察和检查

8.7.1 观察给药期间和给药后试验动物的毒性效应、出现时间、持续时间和程度。如发现濒死动物应及时解剖。每周至少测量一次进食量(或饮水量)和体重。

8.7.2 血液学检查

检测项目包括血红蛋白含量、红细胞数、白细胞数及其分类等。

8.7.3 血液生化检查

检测项目一般应包括肝、肾功能,如血清天冬氨酸氨基转换酶、丙氨酸氨基转换酶、尿素氮、肌酐等。必要时还须检测总蛋白、白蛋白、血糖、总胆固醇、总胆红素、高铁血红蛋白、胆碱酯酶、钾、钠、钙、磷等。

8.8 病理学检查

8.8.1 系统解剖

所有试验动物包括试验过程中死亡的动物都应进行完整的系统解剖和仔细的肉眼观察。肉眼可见的损伤或可疑损伤部位都应采样固定,作进一步组织学检查。

8.8.2 脏器重量

称取脾、肝、肾、肾上腺、睾丸等脏器重量并计算其脏器系数(脏器重/体重 $\times 100\%$)。

8.8.3 组织学检查

对照组和高剂量组动物以及系统解剖时发现的异常组织均需作详细的组织学检查。其他剂量组一般仅在高剂量组有异常发现时进行。附加组动物应对试验组已确证有毒性效应的组织和器官重点检查。检查脏器一般包括脑、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸、卵巢和其他肉眼观察发现有损害或大小出现变化的器官。一般以肝、肾及可疑靶器官为主。此外,还应包括与农药直接接触的组织或器官,如胃等。

9 亚急性经皮毒性试验

9.1 目的

按经皮方式反复给药 21 d,观察由此产生的不良反应,求出无作用剂量。

9.2 试验农药

原药。

9.3 试验动物

按 8.3 进行。

9.4 剂量分组

9.4.1 一般设三个剂量组和一个对照组。必要时还应设溶剂对照组。

9.4.2 最高剂量组应出现明显的中毒效应,但死亡动物数不能妨碍有效的评定。

9.4.3 如果用 1 000 mg/kg 体重以上的剂量给药而未出现任何毒性效应,则不必再设其他更高剂量组。

9.5 给药方法

9.5.1 剃去动物背部体毛,在无损部位均匀地涂敷试验农药,并用无刺激性的塑料膜和纱布覆盖,胶布固定,使农药与皮肤保持良好的接触,并防止被动物舔食。

9.5.2 涂药面积一般不少于动物体表面积的 10%(大鼠约为 20~40 cm²)。高毒农药涂药面积可略减,涂布时要尽量薄而均匀。

9.5.3 如动物敷用农药后,产生严重的皮肤刺激和损伤,要降低试验农药的浓度,重新进行试验。

9.6 给药时间

每天一次,每次 4~6 h,或 5 d/周,共给药 21 d。为了观察毒性效应的可逆性,附加组动物在停止给药后再饲养 14 d,再进行毒效反应的测试。

9.7 临床观察和检查

按 8.7 进行。

9.8 病理学检查

除按 8.8 进行外,尚需增加与农药直接接触的皮肤检查。

10 亚急性吸入毒性试验

10.1 目的

在规定的 3~4 周时期内,按吸入方式反复给药,观察由于连续经呼吸道给药所产生的不良反应,求出无作用剂量。

10.2 试验农药

原药。

10.3 试验动物

按 8.3 进行。

10.4 剂量分组

按 8.4 进行。

10.5 给药方法

10.5.1 应维持被检农药在染毒柜中分布均匀,氧含量不低于 19%。

10.5.2 浓度监测

染毒柜内被检农药浓度应定期或连续监测,并尽可能地维持恒定。

10.6 染毒时间

每天一次,每次 4 h,或 5 d/周。连续染毒 21~28 d。停止染毒后,附加组动物再饲养 14 d,观察毒性反应的可逆性。

10.7 临床观察和检查

按 8.7 进行。

10.8 病理学检查

除按 8.8 进行外,尚需增加与农药直接接触的呼吸系统,如肺等的检查。

11 亚慢性经口毒性试验

11.1 目的

明确试验农药的亚慢性经口毒性效应的表现,取得试验农药亚慢性经口的最大无作用剂量参数,为试验农药慢性毒性试验提供剂量参考数据。

11.2 试验农药

原药。

11.3 试验动物

11.3.1 首选大鼠,4~6 周龄,雌雄各半,组间同性别动物体重均值差异应小于平均体重的 10%。

11.3.2 动物数量

各组雌雄大鼠均不少于 10 只。试验中间剖杀时,应相应增加。

11.4 试验期

3~6 个月。

11.5 剂量分组

一般设三个剂量组和一个对照组。

11.5.1 高剂量组应使动物产生较明显的毒性效应,但动物死亡不应超过 10%。

11.5.2 中剂量组应使动物产生轻微的毒性效应。若设多个中剂量组时,应产生不同程度的毒性效应。

11.5.3 低剂量组不应引起任何毒性效应,属无作用剂量。

11.5.4 对照组除不接触试验农药外,其他应与试验组相同,当试验农药为制剂,对其助剂、添加剂等的生物活性不清楚时,还应设相应的助剂对照组。

11.6 给药途径

11.6.1 给药方式

混入饲料或溶于饮水。连续给予动物,每周 7 d。若因试验农药引起饲料和饮水的适口性不良,影响动物正常摄入量时,可用管饲法。

11.6.2 除营养素外,混入饲料的试验农药一般不应超过 5%。饲料或饮水中的试验农药浓度应定期监测,观察其均匀性和稳定性。

11.7 临床观察和检查

11.7.1 临床观察

外观体征、行为活动及粪便形状等每天逐个观察。详细记录毒性效应出现时间和变化,如发现死亡或濒死动物应及时解剖。体重和食物消耗量每周测量一次。

11.7.2 血液学检查

检查指标包括红细胞计数、白细胞计数及其分类、血红蛋白含量等。检测时间为试验开始时和3个月后及结束时进行,每次检查各剂量组雌雄大鼠至少各6只,非啮齿类动物则全部检查。

11.7.3 尿液检查

检查项目包括外观、pH值、蛋白、糖、隐血(半定量)和沉淀物镜检(半定量)。检测时间和数量同血液检查,并尽可能采用同一动物检查。

11.7.4 血液生化检查

检测项目包括血清天冬氨酸氨基转换酶、丙氨酸氨基转换酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆固醇、总胆红素、胆碱酯酶等。

11.8 病理学检查

11.8.1 系统解剖

所有试验动物包括试验过程中死亡动物都应进行完整系统解剖和详尽的肉眼观察。所有肉眼可见的病变或可疑病变组织都应留样固定,作进一步病理组织学检查。

11.8.2 脏器重量

称取脑、心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸等脏器重量并计算其脏器系数(脏器重/体重 $\times 100\%$)。

11.8.3 病理组织学检查

对照组和高剂量组动物及系统解剖时发现的异常组织均需作详尽的组织学检查。其他剂量组一般仅在高剂量组有异常发现时才进行组织学检查。检查脏器一般包括脑、脊髓、心、肺、肝、脾、肾、胰、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、肾上腺、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、睾丸、附睾、前列腺、卵巢、子宫、乳腺、皮肤、肌肉、骨、淋巴结、眼球等。吸入染毒时,尚应包括呼吸道。

11.9 结果评定

在仔细总结研究各项检测结果,并注意对照组与剂量组之间的统计学差异和各剂量间的剂量反应关系的基础上,评定以下内容。

11.9.1 试验农药的动物经口毒性效应的主要表现。

11.9.2 试验农药的亚慢性经口动物最大无作用剂量。

11.9.3 可供参考的试验农药动物经口慢性毒性试验的适宜剂量范围。

12 蓄积毒性试验

12.1 目的

了解试验农药蓄积毒性的强弱,并为慢性毒性试验及其他有关毒性试验的剂量选择提供参考。

12.2 试验农药

一般用原药,当大鼠经口 LD_{50} 大于5000 mg/kg,或已作过代谢试验有半衰期($t_{1/2}$)数据的,可免去此项试验。

12.3 试验动物

刚成年的哺乳动物,选用大鼠或小鼠,雌雄各半。无经口 LD_{50} 数据者,需预测其经口 LD_{50} 。

12.4 给药方式

采用经口方式。为了准确掌握给药剂量,须采用灌胃法。

12.5 剂量固定的20d蓄积法

12.5.1 剂量分组

将试验动物随机分成四个剂量组,低剂量为 $1/20LD_{50}$,顺次为 $1/10LD_{50}$ 、 $1/5LD_{50}$ 和 $1/2LD_{50}$ 四个剂量组。另设一个阴性(不给药)对照组,每组动物为10只,雌雄各半。

12.5.2 给药时间

剂量组动物每日一次定时给药,连续给药 20 d。

对照组除不给试验农药外,其他条件均与剂量组相同。

12.5.3 观察指标

各剂量组雌雄合计的动物死亡数量。

12.5.4 结果评定

各剂量组均无死亡,即为蓄积性不明显;

如仅高剂量($1/2LD_{50}$)组有死亡,其他组均无死亡,则为弱蓄积性;

如低剂量组无死亡,其他各组间死亡数有剂量反应关系时,则为中等蓄积性;

如低剂量组有死亡,且有剂量反应关系,则为强蓄积性。

12.6 剂量递增蓄积系数法

12.6.1 剂量分组

将试验动物随机分成雌雄两组,每组 20 只。

12.6.2 给药时间及剂量

以 4 d 为一期,连续给药。第一期每只动物给药剂量为 $0.1LD_{50}$,以后各期顺次递增 50%,即第二期为 $0.15LD_{50}$,第三期为 $0.225LD_{50}$,依此类推,直至雌雄两组合计死亡一半(20 只),或继续给药至累计剂量达 $5.0LD_{50}$ 以上(20 d)为止。

12.6.3 给药期间每期(4 d)须按实测动物体重,计算给药绝对量。

12.6.4 结果计算

停止给药后按式(1)计算蓄积系数 K :

$$K = \frac{LD_{50}(n)}{LD_{50}(1)} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中: $LD_{50}(n)$ ——试验动物在给药期间每只动物共摄入试验农药相当的 LD_{50} 数;

$LD_{50}(1)$ ——试验农药对本试验动物的经口 LD_{50} 剂量。

12.6.5 结果评定

按下列标准评定被检农药蓄积毒性强弱:

$K < 1$ 高度蓄积性;

$K \geq 1$ 明显蓄积性;

$K \geq 3$ 中等蓄积性;

$K \geq 5$ 轻度蓄积性。

13 迟发性神经毒性试验

13.1 目的

了解试验农药的迟发性神经毒性,求出迟发性神经毒性无作用剂量。

13.2 试验农药

原药。

13.3 试验动物

13.3.1 选用遗传背景明确、健康、步态正常的母鸡,鸡龄 8~14 个月,体重 1.5~2 kg。

13.3.2 数量

每剂量组母鸡数量应保证在观察结束时存活至少有 6 只。到期处死,如需观察恢复情况,则应在开始实验时增加延长观察期的动物数。

13.4 给药方法

13.4.1 剂量分组

一般设三个不同剂量的试验组,一个阳性对照组和一个空白对照组。其赋形剂等生物活性不明确时应增设一个赋形剂对照组。

13.4.1.1 高剂量组:根据 LD_{50} 和预试验确定,一般采用 LD_{50} 剂量。观察期结束时可引起试验动物胆碱酯酶活性下降,以及部分动物死亡。

13.4.1.2 低剂量组:根据预试验确定,可能引起或不引起迟发性神经毒状,其剂量一般为高剂量的五分之一至十分之一左右。

13.4.1.3 中剂量组:在高低之间,其症状在Ⅱ级以上,少部分动物可达Ⅳ级(见13.6.1)。

13.4.1.4 阳性对照组:500 mg/kg TOCP(三邻甲苯磷酸酯)。

13.4.1.5 空白对照:除不接触试验农药外,其他各种条件与试验组相同。

13.4.2 给药方式

通常采用经口途径,包括灌胃、胶囊吞咽或咽峡部滴注等方法。

13.4.3 给药前预处理

隔夜禁食,经口给药前10 min内,所有试验鸡均肌肉注射10 mg/kg 硫酸阿托品作保护处理。

13.5 试验期限

13.5.1 急性试验

观察期一般为21 d。如未见异常反应或有可疑反应时,须再次给药,继续观察21 d。到期处死作组织病理学检查。如特殊需要,部分动物可延长2~4周或更长时间观察恢复情况。

13.5.2 亚慢性试验

连续给药13周并观察,停药后再观察一周。

13.6 临床观察和检查

13.6.1 中毒症状

给药后每天观察记录试验鸡的外观体征,行为活动,特别是鸡的站立和运动姿势及运动失调程度。必要时可强迫母鸡活动,如爬楼梯等,以便观察迟发性神经毒性的最小反应。其典型症状的分级标准为:

I. 步态稍异常;Ⅱ. 步态严重异常;Ⅲ. 能以跼站立;Ⅳ. 不能站立。一般迟发性神经毒性反应在第7~10 d开始出现并逐渐加重。

13.6.2 每周称体重一次。

13.6.3 病理组织学检查

对死亡动物和到期处死动物检查延髓/桥脑、大脑皮质、小脑皮质、脊髓(包括上位颈段、胸段中部、腰骶结合部和坐骨神经等)并作组织切片。一般用灌注或其他方法,使被检脑神经组织固定在原来位置上。坐骨神经切片要作髓鞘和轴索的特殊染色。光镜观察,必要时可作电镜观察检查。

13.7 数据整理与结果评定

将数据汇总列表,说明每组实验动物数,有上述损伤或异常反应的动物数,出现损伤和异常反应的百分率,并用卡方等统计方法分析组间差异的显著性。评定试验农药能否引起迟发神经毒性及其反应。评定时应结合所观察到的神经毒性效应和神经病理组织学检查结果综合考虑。

14 致突变试验

14.1 目的

检测试验农药的诱变性。预测其遗传危害和潜在致癌作用的可能性。

14.2 试验农药

原药。

14.3 鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)

14.3.1 菌株

本试验至少要用 TA97、TA98、TA100 和 TA102 四种标准突变型菌株。

14.3.2 试剂

14.3.2.1 40%葡萄糖溶液:称取 400 g 葡萄糖,加入蒸馏水稀释至 1 000 mL,在 115℃(0.56 kg/cm²) 10 min 高压下灭菌。

14.3.2.2 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液:

D-生物素(分子量 247.3)	30.9 mg
L-组氨酸盐酸盐(分子量 191.7)	24.0 mg
蒸馏水	250 mL

14.3.2.3 S-9 混合液(按每毫升 S-9 混合液计算):

大鼠肝 S-9	100 μL
MgCl ₂ -KCl 盐溶液	20 μL
6-磷酸葡萄糖	5 μmol
辅酶 I	4 μmol
0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)	500 mμL
无菌蒸馏水	380 mμL

14.3.2.4 盐溶液[1.65 mol/L 氯化钾(KCl)+0.4 mol/L 氯化镁(MgCl₂)]:

氯化钾(KCl)	61.5 g
氯化镁(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	40.7 g
蒸馏水	500.0 mL

在 121℃(15 lb)20 min 高压下灭菌。

14.3.2.5 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲剂(pH 7.4):

磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	0.593 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)	5.803 g
蒸馏水	100.0 mL

在 121℃(1.05 kg/cm²)20 min 高压下灭菌。

14.3.2.6 0.15 mol/L 氯化钾溶液:精确称取氯化钾 11.18 g,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,在 121℃(1.05 kg/cm²)30 min 高压下灭菌,冷却后冰箱保存。

14.3.2.7 氨苄青霉素溶液(8 mg/mL):称取三羟氨苄青霉素 80 mg,加入 0.02 mol/L 氢氧化钠溶液 10 mL。

14.3.2.8 0.1%结晶紫溶液:称取结晶紫 10 mg,加 10 mL 无菌水。

14.3.2.9 四环素溶液(8 mg/mL):称取四环素 40 mg,加入 0.02 mol/L 盐酸溶液 5 mL,用于四环素抗性试验。

14.3.3 培养基

14.3.3.1 顶层培养基:

琼脂	1.2 g
氯化物	1.0 g
蒸馏水	200.0 mL

在 121℃ 30 min 高压灭菌后,加入 0.5 mmol/L 组氨酸-生物素溶液 20 mL。

14.3.3.2 底层培养基:

琼脂	7.5 g
蒸馏水	465.0 mL

在 121℃ 30 min 高压灭菌后,加入(V-B)培养基 E 10 mL 和 40%葡萄糖溶液 25 mL,混匀,按每皿

30 mL 倒平皿,冷凝固化后倒置于 37℃ 培养箱中 24~48 h。

14.3.3.3 Vogel-Bonner(V-B)培养基 E:

硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10.0 g
柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	100.0 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	500.0 g
磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	175.0 g

先将柠檬酸、磷酸氢二钾和磷酸二氢钠溶解后,再加入硫酸镁,待完全溶解后倒入容量瓶中,用蒸馏水稀释至 1 000 mL,分装于锥形瓶内,在 121℃ 30 min 高压下灭菌。

14.3.3.4 肉汤培养基:

牛肉膏	2.5 g
胰胨	5.0 g
氯化钠(NaCl)	2.5 g
磷酸氢二钾(K_2HPO_4)	1.0 g
蒸馏水	500.0 mL

在 121℃ 30 min 高压下消毒。

14.3.3.5 肉汤斜面或平板:

琼脂	7.5 g
肉汤培养基	500.0 mL

在 121℃ 30 min 高压灭菌后,倒斜面或平皿。用于菌株鉴定或常规试验用菌株保存。

14.3.4 溶剂和剂量分组

常用溶剂为蒸馏水、二甲基亚砜。此外还可使用丙酮、二甲基甲酰胺、甲酰胺、95%乙醇等溶剂,最高加入量为 0.1 mL。试验农药的剂量范围可在每皿 0.1~5.0 mg,或对细菌发生毒性的剂量之间。每种试验农药至少设三个剂量组,每个剂量至少三个重复样品。每次试验必须设阳性对照和阴性对照。

14.3.5 标准菌株对阳性诱变剂的反应(见表 9)。

表 9 标准沙门氏菌株对阳性诱变剂的回复反应

诱变剂	剂量(μg)	S-9	TA97	TA98	TA100	TA102
柔毛霉素	6.0	—	124	3 123	47	592
叠氮化钠	1.5	—	76	3	3 000	188
2,4,7-三硝基-9-芴酮	0.2	—	8 377	8 244	400	16
4-硝基-O-次苯二胺	20.0	—	2 160	1 599	798	0
4-硝基喹啉-N-氧化物	0.5	—	528	292	4 220	287
甲基磺酸甲酯	1.0	—	174	23	2 730	6 586
2-氨基芴	1.0	+	1 742	6 194	3 026	261
苯并(a)芘	1.0	+	337	143	937	255

14.3.6 菌株准备与鉴定

14.3.6.1 组氨酸的要求:将组氨酸营养缺陷型菌株分别接种于含有和不含有组氨酸的培养基中,于 37℃ 培养 24 h,观察细菌生长情况。

14.3.6.2 脂多糖屏障缺陷:将含 0.1 mL 试验菌株增菌液的顶层琼脂培养液倒入肉汤琼脂培养基上,冷凝后,将无菌圆形滤纸片置于培养基中央,再滴上 0.1% 结晶紫溶液 10 mL,经 37℃ 培养 24 h。在纸片周围有抑菌圈,即表示结晶紫分子已进入菌体内并抑制其生长。

14.3.6.3 紫外线损伤修复缺陷:将被测菌株在肉汤琼脂培养基上划线,然后用黑纸覆盖一半,在15 W的紫外灯下,距离33 cm处照射8 s,37℃培养24 h后,TA 97、TA 98、TA100和TA102在没有照射的那一半生长,在照射的那一半不能生长。

14.3.6.4 抗氨苄青霉素试验:将带有R因子的菌株TA97、TA98、TA100和TA102在肉汤琼脂培养基上划线,然后把沾有氨苄青霉素溶液的滤纸条与划线交叉,置37℃培养24 h,观察滤纸条周围菌株生长情况。

14.3.6.5 抗四环素试验:将被测菌株增菌液在营养肉汤培养基上划线,待干后,将四环素溶液与菌株划线处交叉划线,经37℃培养24 h后,对四环素有抗性的TA102菌株生长不受抑制。

14.3.6.6 自发回变:每种被测菌株都以一定的频率自发地产生回变。

TA97、TA98、TA100和TA102经过体外代谢活化后,自发回变数要比不经体外代谢活化的自发回变数略高。

14.3.7 操作步骤

平板掺入法:向融化并保温在45℃的2.0 mL顶层培养基试管中依次加入试验农药、0.1 mL增菌液和0.5 mL S-9混合液(或不加S-9混合液)混匀,迅速倾入底层培养基上,使其均匀分布,待上层培养基凝固后,将平板翻转,37℃培养48 h后,计数每皿回变菌落数。

14.3.8 结果评定

试验农药的回变菌落数超过自发回变菌落数的两倍以上,并呈剂量-反应关系,则为阳性。

14.4 小鼠骨髓多染红细胞微核试验

14.4.1 试验动物

小鼠,体重为25~30 g,每个剂量组至少雌雄各5只。

14.4.2 试验材料

14.4.2.1 姬姆萨染液:称取Giemsa染料3.8 g,加入375 mL分析纯甲醇,待完全溶解后,再加入125 mL甘油,放37℃恒温箱中保温48 h,使其充分溶解,过滤,两周后用。

14.4.2.2 磷酸盐缓冲液(pH 7.4):称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)19.077 g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)1.814 g加蒸馏水至1 000 mL。

14.4.2.3 Giemsa应用液:取一份Giemsa液与六份磷酸盐缓冲液混合而成。

14.4.3 剂量分组和给药途径

一般取试验农药 LD_{50} 的1/5、1/10、1/20和1/100等剂量,以观察微核的剂量-反应关系。同时设溶剂对照组和阳性对照组(一般用环磷酰胺)。

根据试验农药的水溶性或脂溶性来确定所用溶剂,常用水、植物油或吐温-80等溶剂。给药途径视试验目的而定,一般用经口灌胃或腹腔注射方式。采用30 h给药法,即两次给药间隔24 h,第二次给药后6 h取材。

14.4.4 操作步骤

14.4.4.1 制片:断延髓处死动物,立即取出胸骨,除去胸骨上的血液和肌肉,横向切断胸骨,暴露骨髓腔,然后用小止血钳挤出胸骨骨髓液。将骨髓液滴在载物片一端的胎牛血清液滴里,仔细混匀,按常规法涂片,在空气中晾干。

14.4.4.2 固定:将骨髓涂片放入甲醇中固定15 min,取出晾干。

14.4.4.3 染色:将骨髓片放入Giemsa应用液中,染色15 min,然后立即用pH7.4磷酸盐缓冲液冲洗。

14.4.4.4 镜检和计数:每只动物计数1 000个多染红细胞。微核率指含有微核的多染红细胞数,以千分率表示。为观察骨髓细胞分裂是否受抑制,求出每只动物骨髓细胞中多染红细胞/成熟红细胞(PCE/NCE)之比。正常情况下PCE/NCE约为1.53~1.68。

14.4.5 结果评定

首先找出受试农药各剂量组和对照组微核95%可信限,查普阿松分布(λ)的可信限表,阳性物组的

95%可信限按正态分布处理。然后绘出试验农药各剂量组和对照组的95%可信限的直线图。最后,各剂量组与对照组进行统计学处理。

根据统计处理结果来评价试验农药是否具有致微核作用。

14.5 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变试验

14.5.1 试验动物

选用成年小鼠或大鼠。

14.5.2 剂量分组

选用1/5、1/10、1/20和1/100LD₅₀剂量为试验组,另设阳性对照和阴性对照各一组,阳性对照组可用环磷酰胺,阴性对照为溶剂对照,每组各为5只动物。

14.5.3 给药方式

可用经口灌入的方式,共染毒两次,间隔24 h,于第二次给药后6 h处死动物,于处死前4 h腹腔注射秋水仙素(按剂量4 mg/kg)。

14.5.4 试验方法

14.5.4.1 用颈椎脱臼法处死动物,取出股骨,剔除肌肉等组织。

14.5.4.2 剪去股骨两端,用注射器吸取5 mL生理盐水,从股骨一端注入,用10 mL离心管,从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

14.5.4.3 将细胞悬液以1 000 r/min的速度离心5~7 min,去除上清液。

14.5.4.4 加入0.075 mol/L氯化钾溶液7 mL用滴管将细胞轻轻地混匀,放入37℃水浴中低渗处理7 min,加入2 mL固定液(冰乙酸:甲醇=1:3),混匀,以1 000 r/min速度离心5~7 min,弃去上清液。

14.5.4.5 加入7 mL固定液,混匀,固定7 min,以1 000 r/min的速度离心7 min,弃去上清液。

14.5.4.6 用同法再固定1~2次,弃去上清液。

14.5.4.7 加入数滴新鲜固定液,混匀。

14.5.4.8 用混悬液滴片,自然干燥。

14.5.4.9 用姬姆萨染液染色。

14.5.5 读片和结果评定

选择分散良好的中期分裂相,在显微镜下进行读片,记录畸变类型。所得各组的染色体畸变率用 χ^2 检验进行统计学处理,以评定试验组和对照组之间是否有明显差异。

14.6 小鼠睾丸精母细胞染色体畸变试验

14.6.1 试验材料

全部试剂除注明外,均为分析纯,试验用水为蒸馏水。

14.6.1.1 1%柠檬酸三钠(AR):取1 g柠檬酸三钠加蒸馏水至100 mL。

14.6.1.2 60%冰乙酸溶液(AR):取60 mL冰乙酸加蒸馏水至100 mL。均应新鲜配制。

14.6.2 试验动物

选用健康成年雄性小鼠,体重25~30 g,每组5只。

14.6.3 剂量分组

设阴性(溶剂)对照组、阳性对照组及三个试验农药剂量组。阳性物可用丝裂霉素C(1.5~2 mg/kg、ip.一次)或环磷酰胺(40 mg/kg、ip.每天一次,连续5 d)。阳性对照组在同一个实验室同一品系动物仅做一次即可,如调换操作人员,应重新再做。试验农药的三个剂量组可根据急性经口LD₅₀,选用可使试验动物出现轻度中毒症状、体重略有下降及不引起动物死亡的剂量为高剂量,以其1/2、1/4LD₅₀为中、低剂量。

14.6.4 给药方法

灌胃,每天一次,连续5 d。

14.6.5 试验步骤

14.6.5.1 各组均于第一次给药后的第12~14 d将试验动物处死制片。

14.6.5.2 动物处死前6 h腹腔注射秋水仙素4~6 mg/kg体重(按0.1~0.2 mL/10 g体重给受试物)。秋水仙素宜当天新鲜配制。

14.6.5.3 以颈椎脱臼法处死小鼠,取出两侧睾丸,去净脂肪,于低渗液中洗去毛和血污,放入盛有适量1%柠檬酸三钠或0.4%氯化钾溶液的小平皿中。

14.6.5.4 用眼科小镊子撕开被膜,轻轻地分离曲细精管,室温下低渗,低渗时间视具体条件而定(一般为20~40 min为宜)。

14.6.5.5 仔细吸尽低渗液,加固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)10 mL,固定20 min。

14.6.5.6 吸尽固定液,加60%冰乙酸1~2 mL,待大部分曲细精管软化完后,立即加入倍量的固定液,打匀、移入离心管,以1 000 r/min离心10 min。

14.6.5.7 弃去大部分上清液,留下约0.5~1.0 mL,充分打匀制成细胞混悬液,将细胞混悬液均匀地滴于冰水玻片上。每个样本制片2~3张。空气中晾干或微热烘干。

14.6.5.8 用1:10 Giemsa液(pH6.8)染色20~40 min。

14.6.6 计算方法和结果评定

实验组与阴性对照组的断片、易位、畸变细胞率、常染色体单价体、性染色体单价体等分别按Kastenbaum和Bowman所述方法或二项分布检验法进行统计处理,如 $P < 0.05$ 则可以认为有显著意义。

14.7 显性致死突变试验

14.7.1 试验动物

选用雄性成年小白鼠(体重30 g以上)或大白鼠(体重200 g以上),预先接触受试物,再进行交配。成年雌鼠经生殖能力预试,受孕率应在70%以上,不接触试验农药。

14.7.2 剂量分组

14.7.2.1 试验至少设三个剂量组,给药量可在 $1/10 \sim 1/3LD_{50}$ 之间,最大剂量也可按人体实际摄入量的100倍计算。并需设阴性与阳性对照组,前者用溶剂对照,后者用环磷酰胺(40 mg/kg体重)。

14.7.2.2 动物数量:雄性动物每组不少于10~15只,雌性动物则按每组不少于20~30只,雌性:雄性为2:1适宜。

14.7.3 给药方法

灌胃法:按体重10 g 0.2 mL体积计算。

喂饲法:按称量记录摄食量与动物体重进行计算。

给药次数:灌胃法一般一日一次,或一日两次,连续6 d或3个月。

14.7.4 试验方法

在雄鼠给药后,按雌雄鼠2:1比例同笼交配6 d,取出雌鼠另行饲养。雄鼠则于一周后,再与同样数量的另一批雌鼠同笼交配,如此共进行6~8批。

14.7.5 观察指数

14.7.5.1 以雌雄鼠同笼日算起第17~19 d,采用颈椎脱臼法处死雌鼠后,立即剖腹取出子宫,仔细检查、计数,分别记录每一雌鼠的活胎数、早期死亡胎数与晚期死亡胎数。

14.7.5.2 胚胎鉴别

活胎:完整成形,色鲜红,有自然运行,机械刺激后有运动反应。

早期死亡胚胎:胚胎形体较小,外形不完整,胎盘较小或不明显。最早期死亡胚胎仅在子宫内膜上隆起如一小瘤。如已完全被吸收,仅在子宫内膜上留一隆起暗褐色点状物。

晚期死亡胚胎:成形,色泽暗淡,无自然运动,机械刺激后无运动反应。

14.7.6 统计分析

根据以上结果,计算出受孕率,总着床数,平均着床数、早期和晚期胚胎死亡率及平均早期胚胎死亡

数予以比较评价。

$$\text{受孕率}(\%) = \frac{\text{孕鼠数}}{\text{交配雌鼠数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$\text{总着床数} = \text{活胎数} + \text{早期胚胎死亡数} + \text{晚期胚胎死亡数} \dots\dots\dots(3)$$

$$\text{平均着床数} = \frac{\text{总着床数}}{\text{受孕雌鼠数}} \quad \dots\dots\dots(4)$$

$$\text{早期胚胎死亡率}(\%) = \frac{\text{早期胚胎死亡数}}{\text{总着床数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(5)$$

$$\text{晚期胚胎死亡率}(\%) = \frac{\text{晚期胚胎死亡数}}{\text{总着床数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(6)$$

$$\text{平均早期胚胎死亡数} = \frac{\text{早期胚胎死亡数}}{\text{受孕雌鼠数}} \quad \dots\dots\dots(7)$$

按试验组与对照组动物的上述指标分别用 X^2 检验,单因素,方差分析或其他检验方法进行统计分析,以评定此农药的致突变性。

15 致畸试验

15.1 目的

测定试验农药能否在胚胎发育时期引起永久性的肉眼可见的形态改变。

15.2 试验农药

原药。

15.3 试验动物

15.3.1 大鼠或小鼠,特定情况下用兔。

15.3.2 各剂量组及对照组应是刚进入性成熟期的雌性大鼠或小鼠 12~20 只,或孕兔 8~12 只。

15.4 交配及受孕检查

让健康性成熟(生后 70~90 d)大鼠雌与雄 1:1 或 2:1 同笼后,检查阴栓或阴道涂片,自发现精子之日作为受孕零天。

15.5 剂量和对照设计

15.5.1 至少应选择三个剂量。高剂量选用引起母鼠体重增重受抑或小于 LD_{10} 的剂量;低剂量用胚胎鼠不产生显著反应的剂量;中间剂量要有助于观察评价剂量-反应关系。

15.5.2 剂量设计

应把急性 LD_{50} 、亚慢性试验最大无作用剂量以及人体实际摄入量作为依据,最好通过预备试验确定各组剂量水平。

15.5.3 如果 1 000 mg/kg 以上的剂量无胎毒作用,则不必设计其他剂量。

15.5.4 应设阴性对照组。除不给试验农药外,对照组的一切处理均同剂量组。

15.5.5 应设阳性对照组。一般应用敌枯双(1 mg/kg),给药方法同所试农药,也可用维生素 A。

15.6 给药时期

给药时期包括器官形成期的主要阶段。大鼠孕后 7~16 d,小鼠为 6~15 d,兔为 6~18 d。

15.7 给药方式

15.7.1 一般采用经口法。

15.7.2 试验农药应在每天的同一时间给药。

15.7.3 每日剂量按给药开始之日母鼠体重计;也可每隔 3 d 称重一次,每日给药量按最重时的体重计。

15.8 母鼠观察

15.8.1 每日应称取母鼠体重,并仔细观察母鼠临床症状,包括皮肤、毛、眼、粘膜、呼吸、神经状态和四肢活动等的变化。

15.8.2 及时观察和记录中毒症状,记载中毒的发生时间、表现程度和持续时间。

15.9 畸形检查

15.9.1 孕鼠处死

分娩前一天处死取胎,避免自然分娩后新生动物被咬死、咬伤。大鼠在孕期第20 d,小鼠第18 d,兔第29 d处死。

15.9.2 剖腹及胎鼠外观检查

处死和死亡的母鼠在死后立即取出子宫称重,记录着床数、活胎数、死胎数(估测死胎发生时间)和吸收胎数,测量其体重、身长和尾长。

15.9.3 大鼠每窝取胎鼠二分之一至三分之一做骨骼检查,其余做内脏及软组织检查(参见表10)。必要时留一部分母鼠让其自然分娩,然后观察仔鼠的畸形。

表10 致畸试验胎鼠体表检查项目

头 部	躯干部	四 肢
无脑症	胸骨裂	多肢
脑膨出	胸部裂	无肢
头盖裂	脊椎裂	短肢
脑积水	脊椎侧弯	半肢
小头症	脊椎前弯	多指
颜面裂	脊椎后弯	无指
小眼症	脐疝	合指
眼球突出	尿道下裂	短指
无耳症	无肛门	缺指
小耳症	短尾、卷尾	
耳低位	无尾	
无颌症	腹裂	
小颌症		
下颌症		
口唇裂		
口盖裂		

15.9.4 检查对胎仔各器官的影响,包括外观和内脏出现的各种畸形(参见表11,表12);检查对胎仔骨骼发育的影响,包括头颅骨、胸骨、前后肢骨和其他骨骼的骨化程度,异变和畸形等(参见表13)。

表11 致畸试验胎鼠内脏检查项目

头部(脊髓)	胸 部	腹 部
嗅球发育不全	右位心	肝分叶异常
侧脑室扩张	房中隔缺损	肾上腺缺失
第三脑室扩张	室间隔缺损	多囊肾
无脑症	主动脉弓	马蹄肾
无眼球症	食道闭锁	膀胱缺失

续表 11

头部(脊髓)	胸 部	腹 部
小眼球症 角膜缺损 单眼症	气管狭窄 无肺症 多肺症 肺叶融合 膈疝 气管食管瘘 内脏异位	睾丸缺失 隐睾症 卵巢缺失 卵巢异位 子宫缺失 子宫发育不全 肾积水 肾缺失 输尿管积水

表 12 致畸试验胎鼠骨骼检查项目

枕骨	骨化中心、发育不全
脊柱骨	数目、融合、纵裂、部分裂开、骨化中心数、发育不全、缩窄、脱离、形状
骨盆	弓数目、骨化中心数、形状异常、融合、裂开、缩窄、脱离
四肢骨	形状、数目
腕骨	骨化中心数
掌骨	形状
趾骨	形状
肋骨	数目、形状、融合、分叉、缺损、发育不全
胸骨	形状、完全缺失、胸骨节融合、裂开、形状异常、发育不全

表 13 致畸试验记录内容

动物交配投药期	解剖检查时	胎仔检查
动物编号	母体解剖所见	体表检查
动物种、品系	卵巢重量	骨骼检查
交配时周龄	黄体数	内脏检查
确认受孕	着床数	
临床症状	胎盘重量	
进食进水量	胎仔子宫内位置	
药物及溶剂	死胎数	
剂量	活胎数	
给药途径	胎仔重	
给药期间		

15.10 数据处理、结果评定

15.10.1 数据汇总成表,全部观察结果须经统计处理,例如胎鼠身长、尾长和体重等用 t 值检验,胎鼠吸收率、死亡率及畸形率用 X^2 处理。

15.10.2 鉴定农药是否有母体毒性,胚胎毒性以及致畸性。如有致畸效应,可得出最小致畸量,以最小致畸量求得致畸指数,表示致畸强度。

$$\text{致畸指数} = \frac{\text{雌性动物 LD}_{50}}{\text{最小致畸剂量}} \dots\dots\dots (8)$$

致畸指数小于 10 为基本无致畸危害；
致畸指数 10~100 为有致畸危害；
致畸指数大于 100 为强致畸危害。

16 两代繁殖试验

16.1 目的

本试验的目的在于获得试验农药对动物亲代生殖与仔代早期发育影响的一般性资料；同时也可在仔代病老、死亡、畸型等方面取得初步资料，为其他有关毒性试验提供参考。

16.2 试验代数

一般进行连续两代各繁殖一窝的试验。以大鼠为例，两代繁殖试验程序见表 14。

表 14 大鼠两代繁殖试验程序表

试验工作周	亲代(P)	子一代(F ₁)	子二代(F ₂)
第 3 周末	出生		
第 4~6 周 ¹⁾	哺乳		
第 7 周	基础饲料喂养		
第 8~15 周	给药喂养		
第 16~18 周 ²⁾	交配(给药)		
第 18 周末	交配结束雄性处死		
第 19~21 周	妊娠(给药)		
第 21 周末		出生	
第 22~24 周 ¹⁾	授乳(给药)	哺乳(每窝留雌性 4 只、雄性 4 只，其余处死)	
第 25 周	全处死	基础饲料喂养	
第 26~33 周		给药喂养	
第 34~36 周 ²⁾		交配(给药)	
第 36 周末		交配结束，雄性处死	
第 37~39 周		妊娠(给药)	
第 39 周末			出生
第 40~42 周 ¹⁾		授乳(给药)	哺乳
第 42 周末		全处死	全处死

注：1) 可以增加 1~7 d；

2) 可能不需 3 周。

16.3 试验农药

试验农药原则上用原药。但如原药有强烈腐蚀性或高毒不适于直接接触动物者，可用生产中使用的制剂。如在试验农药中加有溶剂或其他添加物，而这些物质的毒性不明时，须设溶剂或添加物的动物对照组。

16.4 试验动物

用一种哺乳动物,首选大鼠,而且是一般毒理试验中常用且产仔较多的品系。

16.5 剂量分组

16.5.1 一般设高、中、低三个剂量组。高剂量应能使动物产生明显毒性效应,但死亡不超过10%;低剂量不应使动物出现任何毒性效应;中剂量介于高、低剂量中间,应使动物稍有毒性效应。

16.5.2 每个组至少要有保证能交配的雄性动物10只以上(最好20只),分娩时能有20只妊娠动物;雌性动物须是未经产仔的。

16.5.3 至少要设一个阴性对照组,即除不给试验农药外,其他一切条件均与剂量组相同。有必要和可能时还应设溶剂(添加物或赋形剂)对照组。

16.6 给药时间

以大鼠为例,经哺乳期3~4周后,8周龄前雌雄动物同时给药,给药至少8周后交配,交配期最长持续(雌雄合笼)3周;雌性动物妊娠、授乳期继续给药,直至幼仔断奶为止,雄性动物给药至交配结束为止。动物停药后立即处死检查。

16.7 给药方法

16.7.1 一般是按所定剂量将试验农药掺入饲料中,混合均匀后给药(必要时做化学分析抽查)。

16.7.2 如有必要,也可用灌胃方式或用胶囊给予。在这种情况下,给药量要按逐周、逐只动物的体重计算。妊娠期可按妊娠0d和妊娠第6d的体重,分两阶段计算给药量。

16.8 给药期检查

16.8.1 每日对动物进行仔细的临床观察。

16.8.2 每日记录动物摄食量。

16.8.3 每周称量一次(或两次)体重。

16.8.4 在临给药前、给药4周和8周后,每组动物至少随机抽取雌雄各6只,检查项目至少包括血液Hb浓度、血液RBC数,血液WBC数及分类,AST和ALT。

16.9 交配方法

16.9.1 用于交配的雌雄动物须属于同一剂量组或对照组,但不是同窝所生。

16.9.2 雌雄动物以一对一或二对一合笼方式交配。每日早晨检查阴道中有无精子或阴栓的动物,以检出之日定为妊娠0日,并从即日起将该动物单笼饲养。

16.9.3 交配(合笼)期以3周为限,对届时仍未交配(阴道中迄未发现精子或阴栓)的动物,改换配偶重新交配,以确定未能交配问题属于雌方或雄方;必要时对不交配动物的生殖器官进行病理组织学或发情周期、精子形成周期等的检查,以进一步研究试验农药对动物繁殖可能产生的影响和毒性。

16.10 对动物分娩前后的观察和处理

16.10.1 对雌性动物交配、妊娠和授乳期连续给药。

16.10.2 所有雄性动物在交配后均处死观察。

16.10.3 妊娠动物要单笼饲养,并在分娩前给予造窝材料。

16.11 对新生幼仔的观察和处理

16.11.1 对每一妊娠动物要在分娩后,尽快查清幼仔数、死产仔数、活产仔数以及幼仔外观有无异常和畸形。

16.11.2 检查记录幼仔出生当时及生后4、7、14和21d的体重、身长和尾长以及一窝幼仔出生当时和生后4d的总体重。

16.11.3 幼仔出生后第4d调整留取数。即每窝随机留取幼仔雌雄各4只,雌或雄幼仔有不足4只者,则总数留取8只,幼仔总数不足8只者,则全部留取。此外多余幼仔当时处理掉。

16.12 动物剖检

对下列试验动物在处死后立即进行解剖,并对生殖系统进行肉眼病理检查。

- 16.12.1 所有剂量组与对照组交配后处死的雄性动物,每组随机抽取不少于6只。
- 16.12.2 所有剂量组与对照组在给仔代授乳后处死的雌性动物,每组随机抽取不少于6只。
- 16.12.3 所有剂量组与对照组在断奶后不用于交配而处死的雌雄性动物,每组至少随机抽取雌雄性动物各不少于6只。
- 16.12.4 试验中途死亡或濒死处理的所有动物都应剖检。
- 16.13 病理组织学检查
- 16.13.1 对上项剖检的所有动物,均须在剖检中留取下列组织器官的病理组织学检查标本:阴道、子宫、卵巢、睾丸、附睾、精囊、前列腺和脑下垂体。
- 16.13.2 对上项标本的最高剂量组和阴性对照组(也包括如果设有的阳性对照组及溶剂、添加物和赋形剂对照组)的动物标本以及剖检中发现有意义病变的组织和器官的相应标本,均须作切片镜检。
- 16.13.3 如最高剂量组没有发现有意义的病变,则中、低剂量组的相应动物和器官标本可不制片镜检,也无须继续保存。
- 16.13.4 在16.12.4项动物中发现有意义的病变时,对与之有联系的组织和器官标本,要参考最高剂量组动物标本的检查结果,决定是否有必要进一步检查。
- 16.14 繁殖指数指标
- 16.14.1 交配成功率按式(9)计算:

$$\text{交配成功率}(\%) = \frac{\text{交配成功动物数}}{\text{用于交配的雌动物数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(9)$$

注:交配成功指阴道中检出精子或阴栓者。

- 16.14.2 受孕率按式(10)计算:

$$\text{受孕率}(\%) = \frac{\text{受孕动物数}}{\text{用于交配的雌性动物数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(10)$$

- 16.14.3 活产率按式(11)计算:

$$\text{活产率}(\%) = \frac{\text{产生活仔的雌性动物数}}{\text{受孕动物数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(11)$$

- 16.14.4 出生存活率按式(12)计算:

$$\text{出生存活率}(\%) = \frac{\text{出生后4d幼仔存活数}}{\text{出生当时存活仔数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(12)$$

- 16.14.5 哺育成活率按式(13)计算:

$$\text{哺育成活率}(\%) = \frac{\text{21d断奶时幼仔成活数}}{\text{出生后4d幼仔存活数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(13)$$

16.15 结果评定

按16.14.1~16.14.5各项指标,逐一比较试验组动物与对照组动物之间的差异显著性,以评定试验农药对试验动物有无繁殖毒性,同时还可根据统计学差异出现在哪个指标上,进一步估计繁殖毒性的

损害作用特点。

17 致癌试验

17.1 目的

通过一定途径给予试验动物不同剂量的试验农药,观察试验动物在接近终生的时间内(一般大鼠的试验时间为两年,小鼠为 18 个月)肿瘤发生的情况,以评定长期接触试验农药对整体动物的致癌性。

17.2 试验农药

用原药,并要求多次抽样实测,以保证其稳定性。所用饲料需具有合格证,以确保无黄曲霉毒素或其他可能致癌物。

17.3 实验动物

17.3.1 种属和品系

首选大鼠或小鼠。特殊情况下可选择其他动物,但应阐明原因。

17.3.2 性别

一般使用两种性别,雌雄各半。

17.3.3 年龄和体重

用 4~6 周龄断奶不久的健康动物开始实验。体重差异不超过平均体重的 10%。

17.3.4 数量

应满足统计学要求。大鼠、小鼠每剂量组至少 50 只雌性和 50 只雄性动物。如试验期间计划提前剖杀一些动物,应在实验开始时相应增加。

17.4 剂量分组

一般设三个剂量组和一个对照组。

17.4.1 高剂量组

可使实验动物产生轻度毒性反应,如体重增长轻度抑制(大于 10%),但不应明显改变动物除肿瘤因素外的正常寿命期限。

17.4.2 低剂量组

不影响动物的正常生长、发育和寿命,即不引起任何毒性效应。但应高于人的接触剂量。一般不低于高剂量的 10%。

17.4.3 中剂量组

在高剂量和低剂量之间,一般不低于高剂量组的 10%。如有可能按试验农药的药物动力学来确定。

17.4.4 对照组

除不接触试验农药外,其他应与试验组相同,试验农药为制剂时,还应设助剂或添加剂对照。

17.5 给药途径

经口是致癌试验常用的给药途径,必要时可采用经皮或吸入途径。

17.5.1 经口

a. 给药方式:一般采用将试验农药放于饲料或饮水中连续给予动物,7 d/周。放入试验农药的饲料或饮水,应不影响动物的正常摄入量。若因适口性不良影响摄入量时,可用管饲法。

b. 放入饲料或饮水中的试验农药浓度应定期监测,观察其均匀性和稳定性。除营养素外,混入饲料中的试验农药的最高浓度一般应不超过 5%。

17.5.2 经皮

a. 染毒面积:一般约相当动物体表面积的 10%左右,小鼠约为 5~10 cm²,大鼠约为 20~50 cm²,高毒性物质可略减。必须保证试验农药与皮肤良好接触,并防止动物舔食。

b. 给药频率:每天一次,每周 3~7 次。

17.5.3 吸入

- a. 给药时间:每天 4 h,每周 5~7 d。
- b. 染毒柜空气中氧含量不得低于 19%,换气指数大于 6~10 次/h,温度 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40%~70%(水剂除外)。
- c. 染毒柜内试验农药浓度:应定期或连续监测,其分布应均匀、恒定。固体试验农药尚应测定其颗粒的分散度。

17.6 试验期限

17.6.1 致癌试验期间必须包括试验动物正常生命期的大部分,甚至终生。一般情况下,小鼠 18 个月,大鼠 24 个月,某些生命期较长,自发肿瘤率低的动物品系,试验期可适当延长至小鼠 24 个月,大鼠 30 个月。

17.6.2 当低剂量组或对照组存活动物少于或等于 25%时,应提前结束试验,但有明显性别差异时,不同性别的动物试验时间可以不同。高剂量组因毒作用而过早死亡时,仍可继续试验。

17.6.3 一个合格的致癌试验,在试验期结束时,对照组存活数不应少于 50%。各组因死后组织自溶,被同类动物吃掉或管理不善造成试验动物损失不可超过 10%。

17.7 临床观察和检查

17.7.1 所有动物的外观体征、行为活动、粪便性状等检查,应每天一次。根据试验需要,尤其在试验后期,每天还应增加数次有目的观察,以便及时发现毒作用。如有动物死亡或濒死,应及时解剖,减少试验动物损失率。

17.7.2 记录所有动物出现的中毒症状或死亡情况,尤其应详细记录每个肿瘤的首次发现时间、部位、大小、外形、硬度和发展情况等。

17.7.3 在试验最初 3 个月内,每周测量一次体重、饲料摄入量和试验农药溶于饮水时的饮水量,以后每月一次。

17.7.4 试验期间如动物健康恶化,应进行白细胞计数。在实验结束时,所有处死动物都应做血涂片。高剂量组和对照组还要进行白细胞分类计数。当有差别时,进行其他剂量组的白细胞分类计数。

17.8 病理检查

17.8.1 大体解剖

17.8.1.1 所有试验动物,包括试验过程中死亡或濒死而处死的动物及试验期满处死的动物都应进行解剖和全面的系统的肉眼观察。观察所见的肿瘤和可疑病变部位都应留样,进一步作组织学检查。

17.8.1.2 所有动物的全部脏器和组织都应留样、固定,供进一步系统检验用。一般留样的脏器和组织包括:脑、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、肺(包括气管)、心、唾液腺、肝、脾、肾、肾上腺、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、淋巴结、胰腺、性腺、附性器官、乳腺、外周神经、坐骨神经、脊髓、胸骨或股骨、眼球。在吸入试验时,尚应包括:鼻腔、咽、喉等呼吸道。经皮试验时,应包括与农药接触的皮肤。

17.8.2 病理组织学检查

上述所有脏器和组织都应进行组织切片检查,实施有困难时,可选择性进行镜检,但是对下列情况必须进行镜检:

17.8.2.1 大体解剖时所见的肿瘤或可疑病变组织。

17.8.2.2 试验过程中死亡或因病提前处死的所有动物及高剂量组和对照组的全部动物。

17.8.2.3 如高剂量组和对照组的肿瘤、瘤前病变或增生发生率有明显差别时,则各剂量组所有动物的有关器官和组织都要检查。

17.8.2.4 如高剂量组存活动物明显少于对照组,或产生一些影响肿瘤发生的毒作用时,则中剂量组亦应按上述高剂量组一样进行统检。

17.9 结果评定

根据各组的肿瘤及恶性肿瘤发生率、潜伏期和多发性等进行全面评定。

17.9.1 肿瘤发生率

肿瘤发生率是指试验终了时患瘤动物总数在有效动物总数中所占的百分率,按式(14)计算:

$$\text{肿瘤发生率(\%)} = \frac{\text{患瘤动物总数}}{\text{有效动物总数}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(14)$$

17.9.2 结果判定

凡符合下列情况之一,并经统计学处理有显著差异者,可认为致癌试验结果阳性。若存在剂量反应关系,则判断阳性更可靠。

17.9.2.1 肿瘤仅发生在染毒组,对照组无此类型肿瘤。

17.9.2.2 染毒组和对照组均发生肿瘤,但染毒组发生率明显高于对照组。

17.9.2.3 染毒组中动物多发性肿瘤明显,对照组中无多发性或只有少数动物有多发性肿瘤。

17.9.2.4 染毒组与对照组肿瘤发生率无显著差异,但染毒组肿瘤发生时间较早。

17.9.3 染毒组和对照组肿瘤发生率差别不明显,但癌前期病变差别显著时,不能轻易否定试验农药的致癌性。

17.9.4 自发性肿瘤一般只出现于生命较晚期和好发于内分泌腺或与内分泌功能有密切联系的组织,如垂体、肾上腺、睾丸及乳腺等。

18 慢性毒性试验

18.1 目的

通过一定途径长期、反复给予试验动物不同剂量的试验农药,观察试验动物除肿瘤外的慢性毒性效应、严重程度、靶器官和损害的可逆性。确定无作用剂量(浓度),为拟定人类接触试验农药的每日容许摄入量(ADI)提供依据。慢性毒性试验亦可与致癌试验在同一批动物中联合进行(见第19章)。

18.2 试验农药

原药(具体要求见17.2)。

18.3 试验动物

18.3.1 种属和品系

首选大鼠。需要时可增加一种非啮齿类哺乳动物。

18.3.2 性别

一般使用两种性别,雌雄各半。

18.3.3 年龄和体重

用刚断奶的健康动物开始试验。大鼠一般用4~6周龄。同性别体重差异不大于平均体重的10%。

18.3.4 数量

应满足观察指标的统计学要求。在试验结束时,各剂量组每种性别大鼠不少于10只。非啮齿类不少于4只。

18.4 剂量分组

一般设三个剂量组和一个对照组。

18.4.1 高剂量组

使动物产生较明显的毒性效应,甚至个别动物死亡。

18.4.2 中剂量组

使动物产生轻微的毒性效应。若设多个中剂量组,则应产生不同程度的毒性效应。

18.4.3 低剂量组

不应产生毒性效应。

18.4.4 对照组

除不接触试验农药外,其他与试验组相同。当试验农药为制剂,其助剂、添加剂等生物活性不清楚时,还应设相应的助剂对照组。

18.5 给药途径

一般采用经口。

18.6 给药方式

一般把试验农药混入饲料或溶于饮水,连续给予动物,每周5~7 d。放入试验农药后,若饲料和饮水的适口性不良,影响动物正常摄入量时,则可用管饲法。

除营养素外,混入饲料的试验农药的最高浓度一般不超过5%。饲料或饮水中的试验农药浓度应定期监测,观察其均匀性和稳定性。

18.7 试验期限

大鼠24个月,小鼠18个月。

18.8 临床观察和检查

18.8.1 临床观察

外观体征、行为活动和粪便形状等每天逐个观察。详细记录毒性效应出现时间和变化,如发现死亡或濒死动物应及时解剖。体重和食物消耗量在试验的前13周内,每周测量一次,以后如动物健康状况或体重等无异常改变,则每月测量一次。

18.8.2 血液学检查

检查指标包括红细胞计数、白细胞计数及其分类、血红蛋白含量等。实验开始后每隔6个月及结束时各检查一次。每次检查各剂量组雌雄大鼠各10只。非啮齿类动物则全部检查。

18.8.3 尿液检查

必要时进行。检查项目包括外观、pH值、蛋白、糖、隐血(半定量)和沉淀物镜检(半定量)。检测时间和数量同血液检查,并尽可能采用同一动物检查。

18.8.4 血液生化检查

检测项目包括血清天冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、总蛋白、白蛋白、血糖、总胆固醇、总胆红素、胆碱酯酶等。检查时间和数量同血液学检查。

18.9 病理学检查

18.9.1 系统解剖

所有试验动物,包括试验过程中死亡动物都应进行完整系统解剖和详尽的肉眼观察。所有肉眼可见的病变或可疑病变组织都应留样固定,作进一步组织学检查。

18.9.2 脏器重量

称取脑、心、肺、肝、脾、肾、肾上腺、睾丸等脏器重量并计算其脏器系数(脏器重/体重 $\times 100\%$)。

18.9.3 组织学检查

对照组和高剂量组动物及系统解剖时发现的异常组织均需作详尽的组织学检查。其他剂量组一般仅在高剂量组有异常发现时才进行组织学检查。检查脏器一般包括脑、脊髓、心、肺、肝、脾、肾、胰、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、膀胱、肾上腺、垂体、甲状腺(包括甲状旁腺)、胸腺、睾丸、附睾、前列腺、卵巢、子宫、乳腺、皮肤、肌肉、骨、淋巴结、眼球等。

18.10 根据试验农药的毒作用特点,可对血液生化项目和病理学检查脏器作适当增减。

19 慢性毒性与致癌合并试验

19.1 目的

将试验农药长期反复给予试验动物,同时观察对试验动物的慢性毒性作用和致肿瘤作用,确定慢性毒性的最大无作用剂量和致癌的可能性。

19.2 试验农药

原药(具体要求见 17.2)。

19.3 试验动物

19.3.1 种属和品系

首选大鼠。

19.3.2 性别、年龄和体重

选用雌雄各半、断奶不久的 4~6 周龄的健康动物,同性动物体重差异不超过平均体重的 10%。

19.3.3 数量

各剂量组雌雄动物均 50 只以上,如试验期间计划提前剖杀一些动物,试验开始时要作相应的增加。试验结束时,各剂量组每种性别的动物数量应能满足统计学要求。

19.4 剂量分组

一般设三个剂量组和一个对照组。

19.4.1 高剂量组

应使动物产生轻度毒性效应,如体重抑制(大于 10%),但不应明显改变除肿瘤因素以外的动物正常寿命期限。

19.4.2 低剂量组

应不影响动物的正常生长、发育和寿命,即不产生任何毒性效应。但应高于人的接触剂量,一般不低于高剂量的 10%。

19.4.3 中剂量组

介于高、低剂量之间,如有可能按农药的毒物代谢动力学性质来确定。

19.4.4 对照组

除不给试验农药外,其他条件均与试验组相同。

19.5 给药途径

给药途径有经口、经皮和吸入三种,应根据农药的理化性质和接触方式选择确定。

19.5.1 经口

经口是将农药给予动物的常用途径,一般把农药混入饲料或饮水中连续给予动物(5~7 d/周)。若混入农药后,饲料和饮水适口性不良,影响动物正常摄入量时,可用管饲法。

混入饲料或饮水中的农药浓度要定期监测,观察其均匀性和稳定性,混入的浓度一般不超过 5%。

19.5.2 经皮

剃去动物背部体毛,在无损伤部位均匀地涂敷农药,面积一般不少于动物体表总面积的 10%,大鼠约为 20~50 cm²,小鼠约为 5~10 cm²,高毒农药可略减,必须保证农药与皮肤良好接触,并防止动物舔食。

每天涂抹一次,每周 3~7 次。

19.5.3 吸入

每天染毒 4 h,每周 5~7 d。

染毒柜氧气含量不得低于 19%,换气指数大于 6~7 次/h,温度 22±2℃,相对湿度 40%~70%(水剂除外)。

染毒柜内农药浓度应定期或连续监测,其分布应均匀、恒定。

19.6 给药时间

试验时间应包括试验动物正常生命期的大部分。小鼠一般 18 个月,大鼠一般 24 个月。某些生命期长、自发肿瘤率低的品系,试验期可适当延长至小鼠 24 个月,大鼠 30 个月。

当低剂量组或对照组存活动物小于 25%时,应提前结束试验。但有显著性别差异时,不同性别的动物试验时间可以不同,仅高剂量组因毒性作用而过早出现死亡时,仍可继续试验。

在试验结束时,对照组动物存活率不应少于 50%,各组试验动物意外损失率不得超过 10%。

19.7 临床观察和检查

临床观察、血液学检查、尿液检查、血液生化检查、系统解剖、脏器重量、组织学检查时间和指标同慢性毒性试验和致癌试验。

20 毒物代谢动力学试验

20.1 目的

定量地研究农药在体内的吸收、分布、生物转化和消除的动态过程。为进一步研究农药的毒作用机制和毒性安全评价提供依据。

20.2 内容

20.2.1 测定不同剂量水平试验农药的吸收量和吸收率。

20.2.2 测定一次和多次给药后试验农药在组织、血液和血浆中的分布。

20.2.3 了解排泄途径和速度以及在体内的蓄积性和程度(有条件时可进一步开展生物转化和代谢产物的分离及鉴定)。

20.3 剂量和途径

至少设两个剂量组。低剂量相当于无作用剂量;高剂量组能出现轻度毒性效应。一般用静脉注射或经口给药。

20.4 材料与试剂

20.4.1 试验动物

采用该农药进行其他多项毒性试验所用的动物品种和品系,或者用与人代谢途径接近的动物。一般首选大鼠,其性别视试验要求而定。

20.4.2 试验农药

可用放射性同位素示踪法。要求标记化合物的放射化学纯度达到 99%以上,化学纯度应为 90%以上。放射性标记化合物的活性和给药剂量的放射活性强度,应满足低剂量组各组织中测得的最低灵敏度,并应避免高剂量组的辐射损伤对试验结果的干扰。有条件时,也可采用非标记的试验农药进行动力学实验,要求试验农药的化学纯度在 95%以上。

20.4.3 代谢笼

应用易消除污染的有机玻璃或其他光滑材料制做代谢笼,保证尿、粪分流,避免交叉污染。

20.5 试验步骤

在采用放射性标记试验农药时,测定样品中的放射性强度;有条件时,配合测定化学物原形或代谢物;在采用非标记的试验农药时,至少能测定样品中原形物的浓度。

在采用化学分析测量法时,要求专一性强,灵敏度高,准确度和精确度高(变异系数应在 5%左右),线性范围宽,最低检出浓度应能达到 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ g/mL 或 g。

20.5.1 血液中放射性测定

大鼠股静脉注射或经口给药后,于不同时相从眶静脉或尾端取血。一般于给药后不少于 8 个时相取血测定或最后一个样品的数量小于第一个样品的 25%。所得结果在电子计算机上应用非线性最小二乘法程序包或 MCPKP 自动化药物代谢动力学程序包等进行数据处理。根据血液中放射性-时间半对数曲线的特征,建立和求出不同给药途径下最佳拟合效果的房室模型及其相应的各项主要动力学参数。

20.5.2 组织中放射性测定

根据试验农药在机体内的蓄积程度和对不同组织的影响来确定取样时间和组织。一般情况下,参考血液内放射性强度的峰、谷数据,确定 2~3 个时相取样。测定的脏器一般为心、肺、肾、肝、脾、肾上腺、甲状腺、脑、肌肉、脂肪、皮肤、骨组织和睾丸或卵巢等。根据试验要求也可测定胎盘、孕鼠和胎鼠的血液和有关组织内的放射性强度。

20.5.3 尿和粪中放射性测定

给药后将动物放入有机玻璃代谢笼内,按不同时间分别收集尿和粪,尿收集器置于冰浴中。一般应测定到给药后达到恒定排泄浓度为止。

20.5.4 胆汁中放射性测定

在乙醚麻醉下进行胆道插管,伤口缝合固定后,待大鼠恢复清醒后给药,于不同时间收集胆汁。一般按不同时相,收集 48~72 h 的胆汁。

20.5.5 ^{14}C 标记的试验农药,应在给药后测定呼出气中 $^{14}\text{CO}_2$ 含量。

20.5.6 样品的处理和测定

尿和血浆不经处理直接测定。血液、粪和组织用酸化法处理。采用均相测量法,经淬灭校正后,以 DPM/mL 或 DPM/g 湿重表示各样品中的放射活性。所有样品的制备和测定均采用双份样品,每个样品均取自 3~4 只大鼠。

20.6 结果评定

20.6.1 根据以下毒物代谢动力学的各项主要动力学参数,来评定试验农药在动物体内的吸收、分布和消除的动态规律。

$T_{1/2a}$: a 相半减期;

$T_{1/2b}$: b 相半减期;

k_a : 吸收速率常数;

k_e : 排泄速率常数;

k_m : 代谢速率常数;

T_{max} : 血中最大浓度时间(峰值时间);

c_{max} : 血中最大浓度;

V_c : 中央室表观容积;

V_d : 表观容积;

A_{Uc} : 曲线下面积;

CL : 清除率;

F : 吸收分数(%)。

20.6.2 根据不同时相和不同组织中放射性强度来评定试验农药能否通过血脑屏障、胎盘屏障以及作用的靶组织。

20.6.3 根据尿、粪中放射性的变化规律,了解主要的排泄途径、排出速率和在体内的蓄积性。

附录 A

急性毒性 LD₅₀计算方法

(补充件)

A1 霍恩氏法(Horn)

一般各剂量组使用 8~10 只动物(雌雄各半),常用的剂量系列有两排:

$$\begin{array}{l} 1.0 \\ 2.15 \\ 4.65 \\ 10.0 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1.0 \\ 2.15 \\ 4.65 \\ 10.0 \end{array}} \right\} \rightarrow \times 10^t \quad \begin{array}{l} 1.0 \\ 3.16 \\ 10.0 \\ 31.6 \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1.0 \\ 3.16 \\ 10.0 \\ 31.6 \end{array}} \right\} \rightarrow \times 10^t$$

$t=0, \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$

前排系列的剂量间距较后排系列为小,结果较为精确,所以一般常选用之。

A1.1 预备试验

通常采用 10, 1 000 mg/kg 的剂量,各剂量使用 2~3 只动物。根据 24 h 内动物死亡情况,估计 LD₅₀ 的可能范围,以确定正式试验所用的剂量。

A1.2 正式试验

按预备试验所确定的致死剂量范围选用一组适宜的剂量系列,根据四个剂量组的动物死亡数,从 Horn 氏法 LD₅₀计算用表中,可求出 LD₅₀值及其可信限。

A1.3 此法的优点是简单易行,使用动物少,可用来初步了解受试物的毒性强弱。缺点是所得 LD₅₀的可信限范围较宽,不够精确。

A2 机率单位-对数图解法

A2.1 先把剂量的对数值和相应反应的机率单位用点代表画在图上(用机率对数图纸直接把剂量和死亡百分数画在图上)。画线时应照顾所有图上各点,使点散布在线的上下,并使线上点的距离和线下点的距离能相互抵消,特别注意在死亡率 15%~85%的点,机率单位 4~6 的点,尽量使线接近这部分的点。当直线划定后,由图直线上 50%死亡率(机率单位为 5)的相应剂量对数值,就是半数致死量(LD₅₀)的对数值,经反对数变换后即得 LD₅₀的剂量。

A2.2 半数致死量(LD₅₀)的可信限估计

A2.2.1 LD₅₀的标准差 S 按式(A1)计算:

$$S = \frac{X_2 - X_1}{Y_2 - Y_1} \dots\dots\dots (A1)$$

式中: S 为标准差, X₂、X₁ 相当于 Y₂=6、Y₁=4(概率单位)时相应的 X 轴上的对数剂量。

A2.2.2 估计 logLD₅₀的标准误:

$$S_{\log LD_{50}} = \frac{S}{\sqrt{\frac{N'}{2}}} \text{ 或 } \sqrt{\frac{2S^2}{N'}} \dots\dots\dots (A2)$$

式中: N' —— 反应为 16%~84%之间所用试验动物数。

半数致死量对数值的 95% 可信限为 $\log LD_{50} + 1.96 S$ 。

$\log LD_{50}$, 经反对数变换后, 可得到 LD_{50} 的 95% 可信限剂量。

A2.2.3 该法一般要求每剂量组使用不少于 10 只动物, 但各组动物数不一定均等。此法不要求剂量组呈等比关系, 但等比可使各点距离相等, 利于作图。本法优点是不需繁琐的计算。

A3 寇氏法(Karbermethod)

该法是一种计算简便, 易于理解, 而且计算结果比较准确的一种方法。

依本方法设计时, 剂量范围可宽些, 剂量组必须多, 但组间对数剂量差(组距)可以小些。

A3.1 预备试验

一般应求得动物全部死亡(或 90% 以上死亡的剂量)和动物不死亡(或 10% 以下死亡的剂量), 分别作为正式试验的最高与最低剂量。

A3.2 正式试验

一般设 5~10 个剂量组。将上述最高、最低剂量均换算为常数, 然后将最高、最低剂量的对数差, 按所需要的组数, 分为几个对数等距(也可以不等距)的剂量组。

A3.3 试验结果的计算和统计

A3.3.1 列出试验数据及其计算表: 包括各组剂量(mg/kg)、剂量对数(X)、动物数(n)、动物死亡数(Y)、动物死亡百分比(P , 以小数表示)以及统计公式中要求的其他计算数据项目。

A3.3.2 LD_{50} 的计算公式: 根据试验条件及试验结果, 可分别选用下列三个公式中的一个, 求出 $\log LD_{50}$ 。

A3.3.2.1 按本试验设计得出的任何结果, 均可按式(A3)计算:

$$\log LD_{50} = \frac{1}{2} \sum (X_i + X_{i+1})(P_{i+1} - P_i) \quad \dots\dots\dots (A3)$$

式中: X_i, X_{i+1} 及 P_i, P_{i+1} 分别为相邻两组的剂量对数以及动物死亡百分比。

A3.3.2.2 按本试验设计, 且各组间剂量为对数等距时, 可按式(A4)计算:

$$\log LD_{50} = X_k - d/2 \sum (P_i + P_{i+1}) \quad \dots\dots\dots (A4)$$

式中: X_k ——最高剂量对数;

d ——相邻两剂量对数值的差数。

A3.3.2.3 若试验条件同 A3.3.2.2, 且最高、最低剂量组动物死亡百分比分别为 1.0(全死)和 0(全不死)时, 则可用更便于计算的式(A5):

$$\log LD_{50} = X_k - d(\sum P - 0.5) \quad \dots\dots\dots (A5)$$

式中: $\sum P$ ——各组动物死亡百分比之和。

A3.3.3 标准误与 95% 可信限

A3.3.3.1 $\log LD_{50}$ 的标准误:

$$S_{\log LD_{50}} = d \sqrt{\frac{\sum P - \sum P^2}{n}} \quad \dots\dots\dots (A6)$$

A3.3.3.2 95%可信限 = $\log^{-1}(\log LD_{50} \pm 1.96 S_{\log LD_{50}})$ (A7)

附录 B

试验质量控制

(参考件)

B1 人员和组织形式

B1.1 试验课题负责人应由具有高级技术职务的毒理学专家担任。

B1.2 试验人员应是具有毒理学试验经验或经过毒理学试验培训的技术人员,其中具有中级技术职务以上的毒理学技术人员应占二分之一以上。

B1.3 为农药登记进行的毒理学试验实行质量保证制度,承担试验单位应建立质量保证部门或指定质量保证人。质量保证部门负责人或质量保证人应是具有高级职务的毒理学专家,他们不能是课题组成员,不参加试验,但要对试验的设计、实施、结果分析负有监督、检查的责任并签署意见。

B1.4 建立切实可行的试验管理制度,从试验接收、方案设计、实施、到结果分析、试验报告以及日常的仪器、设备、动物、试剂管理要有明确的职责。

B2 仪器、设备

应具备适应试验需要的试验动物房、实验室、资料档案室等。

B2.1 试验动物房

试验动物房的温度、湿度、通风、光照、消毒隔离和笼架应符合我国试验动物管理的有关规定,并取得国家试验动物管理委员会颁发的合格证书。

B2.2 实验室

应具备承担试验的生化检查、病理组织学检查、外科学检查、尸检等实验室,并建立标准的操作规程(SOP)。

B2.3 资料档案室

应具备处理、贮存和检索试验方案、标本、原始资料和试验报告等资料的档案室。

B3 试验农药

试验开始前要明确试验农药的来源和基本性质。

B3.1 来源

接收农药要明确来源,详细记录提供试验农药的单位、人员、生产批号、接收日期和接收人员等。

B3.2 理化性质

要明确试验农药的基本性质。包括名称、有效成分及其含量、剂型、主要理化性质等。

B4 试验动物

根据不同的试验,选用不同种类和不同级别的试验动物。

B4.1 急性、亚急(慢)性等试验期在6个月以内的试验选用一级(普通)或二级(清洁)试验动物。

B4.2 试验期在6个月以上的慢性毒性试验选用二级(清洁)试验动物。

B4.3 致癌试验选用二级(清洁)或三级(无特定病原体)试验动物。

B5 动物管理

B5.1 饲养

分笼饲养,每笼动物数目以不影响观察为宜,一般不超过 5 只。

B5.2 饲料

用实验室常规饲料。饲料应满足动物的营养需要,应定期测定饲料中各种营养成分的含量。标准饲料应注明供应单位和饲料规格,若自己配制,应提供配方。

长期喂养试验,要定期检测饲料中对癌变具有潜在影响的饲料成分和污染物,如抗氧化剂、不饱和脂肪酸、有机氯、有机磷杀虫剂、多环芳烃、重金属、亚硝胺、真菌毒素、消毒剂环氧乙烷等。

B5.3 饮水

饮用水应符合饮用水标准,要定期了解饮用水污染情况。

B5.4 试验动物的饲养、饮水、清洗等要有专人管理。动物饲养室及笼子应定期消毒。

B6 资料管理

B6.1 试验过程中的原始记录要完整、及时、准确、清楚,要有固定格式,详细记录每一个数据。

B6.2 观察指标的测试结果要用设计合理的图表显示,原始数据要选用适当的统计学方法加以处理,要有明确的结论。

B6.3 试验报告

在原始记录的基础上要整理出试验报告,试验报告的封面要写明试验项目名称、试验单位和日期。

试验报告开头要写明试验项目负责人、试验人员、动物管理人、质量监督人的姓名、职称和本人签名,试验报告要加盖单位公章。

试验报告要包括目录、摘要、前言、材料和方法、结果和讨论、结论、参考文献、附图表等,装订要完好,页码要清楚。

B7 检查

试验单位应接受国家主管部门或主管部门指派人员的检查。

附加说明:

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由农业部农药检定所归口。

本标准由农业部农药检定所,中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所,哈尔滨医科大学,上海市劳动卫生职业病防治研究所,化工部沈阳农药安全评价中心负责起草。

本标准主要起草人张子明、王淑洁、于守洋、李真观、王捷、杨永珍。