

两种测定农药在大鼠和小鼠体内毒性蓄积的方法

梁宇杰¹, 王会平², 李 薇², 张祥雪¹, 伍一军²

(1. 北京林业大学理学院, 北京 100083;

2. 中国科学院动物研究所分子毒理学实验室, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

【摘要】 目的 了解有机磷酸酯和氨基甲酸酯类农药在大鼠和小鼠体内的蓄积毒性效应, 建立评价这两类农药在大鼠和小鼠体内的蓄积毒性测定方法。方法 采用2种评价方法 大鼠的剂量固定20 d蓄积法和小鼠的剂量递增法同时对这两类杀虫剂的蓄积毒性进行测试。结果 所测定的这两类共8种杀虫剂蓄积系数均大于5, 在机体内属于轻度蓄积。结论 固定剂量法和剂量递增法均可用于大鼠和小鼠的体内蓄积毒性评价。常用的有机磷和氨基甲酸酯类农药蓄积性较弱。

【关键词】 杀虫剂; 有机磷酸酯; 氨基甲酸酯; 蓄积毒性

【中图分类号】 TQ450.2 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1671-7856(2009)05-0062-04

Two Methods for Testing Cumulative Toxicity of Pesticides in Rats and Mouse

LIANG Yu jie¹, WANG Hui ping², LI Wei², ZHANG Xiang xue¹, WU Yi jun²

(1. College of Science, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Laboratory of Molecular Toxicology, State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Objective To develop a method for evaluating the cumulative toxic effects of these widely used organophosphate and carbamate pesticides exposed to rats and mice. **Methods** Wistar rats and ICR mice were treated with four kinds of organophosphorus pesticides and four kinds of carbamate pesticides at a fixed dosage during 20 days experiment period or an increased dosage with increase every four days during the same experiment days, respectively. After 20 days consecutive administration, the animal death rates were calculated and the toxicity of the pesticides were evaluated. **Results** the number of dead animals in each group is less than 50% of the total; the cumulative coefficient K is more than 5 ($K > 5$). **Conclusion** The procedure described in the present study is simple and easy to deal with. Both the organophosphate and carbamate pesticides are weak cumulative toxicity.

【Key words】 Pesticide; Organophosphate; Carbamate; Cumulative toxicity

农药在农业增产和害虫防治以及疾病传染媒介生物的控制中起着重要的作用,但同时所造成生态环境污染和各类急慢性中毒问题也不容忽视。我国目前大量使用的农药主要是有机磷、氨基甲酸酯和

拟除虫菊酯类,而前两类则是目前应用最为广泛的化学杀虫剂,有关它们的毒性作用机理已有较为深入的研究。然而,生活环境中对这两类杀虫剂的接触往往是长时间的低水平暴露,而长期低剂量接触

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A02)。

[作者简介] 梁宇杰, 硕士生, 从事环境毒理学研究。

[通讯作者] 伍一军, 博士生导师, 研究方向: 分子毒理学。E-mail: wuyj@ioz.ac.cn

农药很可能会引起慢性毒性,甚至引发癌症和其他遗传性疾病^[1]。这类毒性通常与这些化合物在体内不能完全降解,并在机体内蓄积有关。开展药物蓄积毒性试验,通过建立一种短期毒性测定方法,以初步判断农药的慢性毒性作用,这也是确定这类化学物质是否会在机体内残留蓄积的较为理想的方法。目前已经建立了多种蓄积风险评估方法,常用的有危险指数法、相对强度系数法和毒理动力学模式测定等。这些方法各有优缺点,但大多需要较多的实验动物和较长的测定时间,耗费较大。

为了更深入地了解目前常用农药在机体内的蓄积程度,为制订农药相关安全标准提供资料以及为开展化学农药的亚慢性和慢性毒性实验研究提供基础数据,我们分别采用大鼠 20 d 蓄积法和小鼠递增剂量法开展了有机磷和氨基甲酸酯这两类常用农药的蓄积毒性风险评估。

1 材料和方法

1.1 试剂

实验用农药敌敌畏(dichlorvos)、毒死蜱(chlorpyrifos)、水胺硫磷(isocarbophos)、马拉硫磷(malathion)、灭多威(methomyl)、残杀威(propoxur)、抗蚜威(pirimicarb)、西维因(carbaryl)均为工业品级原药(纯度 95% 以上)。玉米油为市售压榨玉米胚芽油。

1.2 试剂配制

将所测试农药以玉米油为载体,搅拌混匀,灌胃染毒。每天称量大小鼠体重计算灌胃量。大鼠按照 5 mL/kg 的体积剂量灌胃,小鼠按照 10 mL/kg 体积剂量灌胃,对照组给以相应量的载体油灌胃。

1.3 试验动物

清洁级 Wistar 大鼠(合格证号:0112709),体重 200~220 g;清洁级 ICR 小鼠(合格证号:0118991),体重 25~30 g,雌雄各半,由北京维通利华实验动物中心提供。实验动物饲养于中科院动物研究所动物房,动物饲养条件为明暗周期 12 h,室温为(25±3)℃,相对湿度为(50±10)%。大鼠单笼喂养,小鼠每 5 只合笼饲养,自由摄食饮水。适应饲养 5 d 后,随机分组,再进行灌胃染毒。

1.4 蓄积评价方法

采用两种蓄积评价方法同时进行蓄积评价。通过查阅 EPA 数据库及相关毒性资源库获得实验用农药的半数致死量 LD₅₀ 值^[2-9](表 1)。按大小鼠不同性别各自的 LD₅₀,计算各组染毒剂量。

表 1 供试农药的经口毒性

Tab. 1 Oral toxicity of the tested pesticides to rat and mouse

供试农药 Pesticide	LD ₅₀ (mg/kg body weight)			
	大鼠 Rat		小鼠 Mouse	
	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female
水胺硫磷 Isocarbophos	28.5	46	11	13
马拉硫磷 Malathion	1634	1751	1260	855
毒死蜱 Chlorpyrifos	163	135	102	70
敌敌畏 Dichlorvos	80	56	61	108
灭多威 Methomyl	20.2	25.4	10	11
残杀威 Propoxur	126	94	39	37
西维因 Carbaryl	850	500	650	438
抗蚜威 Pirimicarb	147	68	107	75

1.4.1 剂量固定的 20 d 蓄积法:按照化学物安全性毒理学评价程序^[7]要求,采用经口灌胃染毒方式,将大鼠随机分为 5 组,包括阴性对照组和 1/20 LD₅₀、1/10 LD₅₀、1/5 LD₅₀和 1/2 LD₅₀共 4 个染毒剂量组,每组动物数 10 只,雌雄各半。每日染毒 1 次,连续染毒 20 d。观察每组染毒大鼠的死亡数量。试验结束时根据下列标准进行评定:①各剂量组均无死亡,即为蓄积性不明显;②如仅 1/2 LD₅₀剂量组有死亡,其他组均无死亡,则为弱蓄积性;③如 1/20 LD₅₀剂量组无死亡,其他各组间死亡数有剂量效应关系时,则为中等蓄积性;④如 1/20 LD₅₀剂量组有死亡,且有剂量效应关系,则为强蓄积性。

1.4.2 递增剂量法:经灌胃给药对 20 只小鼠(雌雄各半)进行染毒处理,采用剂量递增蓄积系数法^[8]进行观察。每天以受试农药灌胃 1 次,试验开始的最初 4 d,每天灌 0.1 倍的半致死剂量 LD₅₀,以后每 4 天按照半致死剂量 LD₅₀的 0.15 倍、0.22 倍、0.34 倍和 0.5 倍的剂量递增。按公式 $K = LD_{50}(n) / LD_{50}(1)$ 计算蓄积系数 K(公式中 LD₅₀(n)为 20 d 蓄积试验时表示引起一半动物死亡的累积总剂量,LD₅₀(1)表示引起一半动物死亡的一次剂量)。评定标准当 $K \geq 5$ 时,为弱蓄积性;当 $3 \leq K \leq 5$ 时,为中等蓄积性;当 $1 \leq K \leq 3$ 时,为强蓄积性。如果连续染毒已达 20 d(总累计剂量达到 5.3LD₅₀),染毒大鼠均未出现 50% 死亡时,则表示该受试农药的蓄积毒性不明显,试验可以终止。

2 结果

2.1 中毒症状

2.1.1 有机磷酸酯类农药: 大鼠经口灌胃 4 种有机磷农药后主要在 1/2 LD₅₀ 和 1/5 LD₅₀ 剂量组相继出现流涎、肌肉震颤、全身抖动、抽搐、共济失调、惊厥出汗、呕吐甚至死亡等典型的胆碱能毒性的症状。不同农药中毒的潜伏期、高峰期、恢复期等过程基本相似, 只是症状的出现和持续时间及中毒程度有所差异。

2.1.2 氨基甲酸酯类农药: 氨基甲酸酯类杀虫剂的中毒症状与大鼠经口灌胃有机磷农药后出现的症状基本相似, 但其中毒的持续时间较短, 症状程度较轻, 潜伏期、高峰期、恢复期均明显缩短, 尤其是恢复

很快, 通常在 1 h 之内恢复。

2.2 蓄积毒性

2.2.1 大鼠蓄积毒性: 由表 2 可见, 大鼠蓄积毒性实验中所有的有机磷和氨基甲酸酯农药在高剂量 (1/2 LD₅₀) 时都能不同程度地引起实验动物死亡, 其中敌敌畏和水胺硫磷还会引起 1/5 LD₅₀ 组死亡 1 只, 说明这些杀虫剂都具有一定的蓄积性, 但是它们都不能引起 1/20 LD₅₀ 组的实验大鼠死亡, 也未见有其它组间有剂量反应关系, 因而判定这些农药的蓄积程度属于弱蓄积性。另外发现, 有机磷农药染毒后大鼠的死亡数普遍比氨基甲酸酯类农药染毒的死亡数多, 提示有机磷农药相对具有更大的毒性。

表 2 农药蓄积毒性测定结果

Tab. 2 Cumulative toxicity of organophosphorus and carbamate pesticides to rats

供试农药 Pesticide	动物死亡数(只)Numbers of animal death				蓄积毒性 Cumulative toxicity	
	1/20 LD ₅₀	1/10 LD ₅₀	1/5 LD ₅₀	1/2 LD ₅₀		
有机磷酸酯类 Organophosphates	水胺硫磷 Isocarbophos	-	-	1 ♀	2 ♂, 4 ♀	弱 Weak
	马拉硫磷 Malathion	-	-	-	1 ♂, 4 ♀	弱 Weak
	毒死蜱 Chlorpyrifos	-	-	-	5 ♂, 5 ♀	弱 Weak
	敌敌畏 Dichlorvos	-	-	1 ♀	4 ♂, 5 ♀	弱 Weak
氨基甲酸酯类 Carbamates	灭多威 Methomyl	-	-	-	2 ♀	弱 Weak
	残杀威 Propoxur	-	-	-	1 ♀	弱 Weak
	西维因 Carbaryl	-	-	-	3 ♂	弱 Weak
	抗蚜威 Pirimicarb	-	-	-	2 ♂, 3 ♀	弱 Weak

2.2.2 小鼠蓄积毒性: 小鼠递增剂量法蓄积毒性试验与大鼠相对应, 在 20 d 的连续染毒实验中, 发现小鼠主要在剂量递增到 0.5 倍 LD₅₀ 时才出现少量死

亡, 但未见有死亡数过半的染毒组(表 3), 此时灌胃总累计剂量达到 5.3 LD₅₀, 蓄积系数 K 大于 5, 表明这些受试农药的蓄积毒性不明显。

表 3 递增剂量法测定有机磷与氨基甲酸酯农药在小鼠体内的蓄积毒性(小鼠死亡数)

Tab. 3 Cumulative toxicity observed in mice treated with the pesticides at dosages increased by degrees (death number)

染毒时间(天) Administration time (days)	1~4	5~8	9~12	13~16	16~20	蓄积系数(K) Cumulative coefficient	
	染毒剂量(×LD ₅₀) Dosage	0.1	0.15	0.22	0.34		0.5
有机磷酸酯类 Organophosphates	水胺硫磷 Isocarbophos	-	-	-	-	2 ♀	> 5.3
	马拉硫磷 Malathion	-	-	-	-	2 ♂, 1 ♀	> 5.3
	毒死蜱 Chlorpyrifos	-	-	-	-	2 ♂	> 5.3
	敌敌畏 Dichlorvos	-	-	-	1 ♂	4 ♂, 3 ♀	> 5.3
氨基甲酸酯类 Carbamates	灭多威 Methomyl	-	-	-	-	-	> 5.3
	残杀威 Propoxur	-	-	-	-	1 ♂	> 5.3
	西维因 Carbaryl	-	-	-	1 ♂	2 ♂, 1 ♀	> 5.3
	抗蚜威 Pirimicarb	-	-	-	-	1 ♂, 2 ♀	> 5.3

3 讨论

蓄积毒性是外源化学物质基础毒性研究重要内容之一, 是评估毒物是否容易引起慢性中毒的一个有效指标, 也是我国食品安全性毒理学评价的重要检测内容之一。本研究中对常用化学农药的蓄积毒

性进行测定, 针对同一种农药同时采用了两套评价体系, 一种是食品安全毒理学领域中通用的评价方法即剂量固定的 20 d 蓄积法, 以大鼠为实验动物利用 4 个固定剂量组进行连续染毒 20 d; 另一种方法是比较简易的药理毒理学研究中常用的定期递增剂

量法,以小鼠为实验动物。从大鼠剂量固定法中得出 4 种有机磷农药(敌敌畏、毒死蜱、水胺硫磷、马拉硫磷)和 4 种氨基甲酸酯类农药(残杀威、灭多威、西维因、抗蚜威)都属于弱蓄积性,但有机磷农药染毒组较氨基甲酸酯类农药染毒组死亡动物数多,提示前者的毒性更大。小鼠的递增剂量法试验中出现部分小鼠死亡,但是死亡总数未过半,推知这 4 种有机磷农药和 4 种氨基甲酸酯类农药的蓄积系数 K 都大于 5,属于轻度蓄积。综合两方面实验的结果可以得知,多数常用的有机磷农药和氨基甲酸酯类农药在体内都属于轻度蓄积或具有弱蓄积性。两种分析方法各有优缺点,但都得出所测农药在体内轻度蓄积的结果,但是 20 d 固定蓄积法所需的实验动物数较多,而后一种评价方法(剂量递增法)只需要 20 只小鼠即能求出蓄积系数。因此在较大规模的实际药物蓄积毒性评价时可根据评价要求及测试药物的各自特性选择所需方法。

另外,鉴于这些测试农药染毒后实验动物都出现少量死亡,提示其毒性的存在,虽然为弱蓄积性,但在农药安全使用上还应引起足够注意,尤其施药人员连续作业时需注意施用剂量及防护措施,以免发生蓄积性中毒。

参考文献:

- [1] Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates[J]. *Toxicol Lett*, 2001, 120(3): 343- 351.
- [2] USDA Extension service/ National agricultural pesticide impact assessment program. Pesticide information profiles: Chlorpyrifos[EB/ OL]. <http://extoxnet.orst.edu/pip/chlorpyr.htm>. [1998 06 09].
- [3] USDA Extension service/ National agricultural pesticide impact assessment program. Pesticide information profiles: Carbaryl[EB/ OL]. <http://extoxnet.orst.edu/pip/carbaryl.htm>. [1998 06 09].
- [4] USDA Extension service/ National agricultural pesticide impact assessment program. Pesticide information profiles: Methomyl[EB/ OL]. <http://extoxnet.orst.edu/pip/methomyl.htm>. [1998 06 09].
- [5] JMPR Monographs and Evaluations. Monographs of toxicological evaluations[EB/ OL]. <http://www.inchem.org/pages/jmpr.html>. [2008 02 28].
- [6] Siroki O, Instiőrisa L, Nebőza M, et al. A study on genotoxic and immunotoxicological effects of subacute propoxur and pirimicarb exposure in rats[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2001, 50(1): 76- 81.
- [7] 周立人. 化学物质安全性评价程序[J]. *中国公共卫生学报*, 1992, 11(1): 37- 40.
- [8] 沈建忠. *动物毒理学*[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 101- 103.

[修回日期]2009 01 06