

敌敌畏经口灌胃小鼠急性 毒性实验最大耐受剂量的测定



实验目的

- 熟悉急性毒性最大耐受剂量（Maximum Tolerated Dose, MTD）的测定方法。
- 掌握受试物溶液的配制方法。
- 掌握随机分组方法。
- 掌握小鼠灌胃技术。
- 掌握小鼠临床中毒症状的观察方法。
- 复习小鼠解剖技术。



实验原理

- 在24小时内一次或多次给予受试物后，观察实验动物所产生的急性毒性反应及其严重程度、中毒死亡特征以及可能的死亡原因。
- 参照急性毒性实验上下法（Up-and-down procedure, UDP）设计实验，根据受试物毒性反应与剂量的关系，确定本实验条件下测定的MTD剂量和最小致死剂量（Minimal Lethal Dose , MLD)。

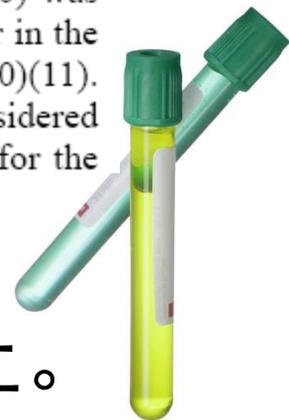


OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)

INTRODUCTION

1. OECD guidelines for the Testing of Chemicals are periodically reviewed in the light of scientific progress or changing assessment practices. The concept of the up-and-down testing approach was first described by Dixon and Mood (1)(2)(3)(4). In 1985, Bruce proposed to use an up-and-down procedure (UDP) for the determination of acute toxicity of chemicals (5). There exist several variations of the up-and-down experimental design for estimating an LD50. This guideline is based on the procedure of Bruce as adopted by ASTM in 1987 (6) and revised in 1990. A study comparing the results obtained with the UDP, the conventional LD50 test and the Fixed Dose Procedure (FDP, OECD Test Guideline 420) was published in 1995 (7). Since the early papers of Dixon and Mood, papers have continued to appear in the biometrical and applied literature, examining the best conditions for use of the approach (8)(9)(10)(11). Based on the recommendations of several expert meetings in 1999, an additional revision was considered timely because: i) international agreement had been reached on harmonized LD50 cut-off values for the



● 经典的LD50方法已于2002年被OECD废止。

实验目的

- 从急性角度来评价化学物毒性的大小。
- 为亚急性、亚慢性和慢性实验提供依据。



上下法的优缺点

- 相比经典的急性毒性实验，动物数量大大减少，遵循3R原则，更符合动物福利要求。
- 不但可以进行毒性表现的观察，还可以估算LD₅₀及其可信区间。
- 试验周期可能很长。适合于能引起动物快速死亡的受试物。



影响急性毒性实验结果的因素

- 物种差异
- 年龄
- 健康状况
- 环境条件

在不同实验室同一受试物所得结果也会有所差异。



LD50及其可信区间的计算

美国EPA开发了相应的计算软件，AOT425StatPgm

TEST / SUBSTANCE: Enter test description

TEST TYPE: Main

LIMIT DOSE: 2000

Assumed values at start of the main test:
LD50: Default **Sigma:** 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1		175			
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					

材料和试剂

实验动物的选择

- 健康ICR或者昆明小鼠
- 雌性
- 8-12周龄
- 体重 ($30 \pm 5\text{g}$)
- 适应性喂养
- 禁食，不禁水（不超过18 h）



实验仪器和器材

- 称鼠天平
- 涡旋混匀器
- 灌胃针

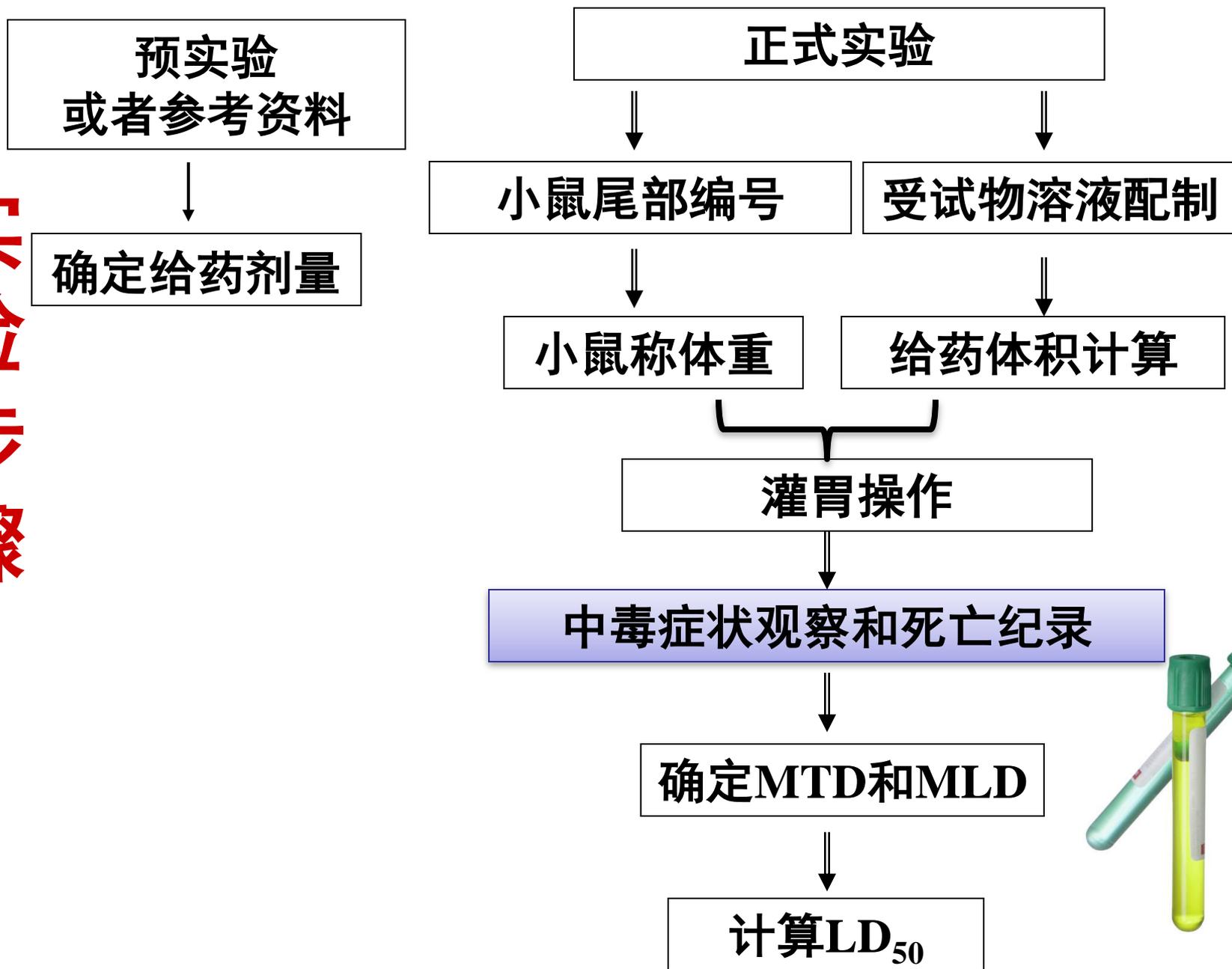


受试物（敌敌畏）



国标编号	61874		
CAS号	62-63-7		
中文名称	敌敌畏		
英文名称	dichlorvos		
别名	DDVD; 2, 2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯; Vapona; Nuvan; Nogos等		
分子式	$C_4H_7O_4Cl_2P$; $(CH_3O)_2POOCHCl_2$	外观与性状	无色至琥珀色液体，有芳香味
分子量	220.98	蒸汽压	9.9Pa/40℃; 1.60Pa/20℃
沸点	35℃(6.667Pa)	溶解性	室温下水中的溶解度约为10g/L，在煤油中溶解2~3%，能与大多数有机溶剂和气溶胶推进剂混溶
密度	1.415	稳定性	对热稳定，但能水解
危险标记	14(有毒品), 34(易燃液体)	毒理学资料	急性毒性: $LD_{50} 50\sim 92\text{mg/kg}$ (小鼠经口); $50\sim 110\text{mg/kg}$ (大鼠经口)

实验步骤



剂量设计

➤ **Dose 1=?** 100mg/kg OR 80mg/kg

➤ **Dose 2=?**

- Dose 1 死亡，降低剂量
- Dose 1 存活，根据毒性症状选择降低剂量或者继续给药。



编号标记

- 记号笔尾部标记。

适用于短期标记1~2天，长期实验则需要用记号笔继续加深。

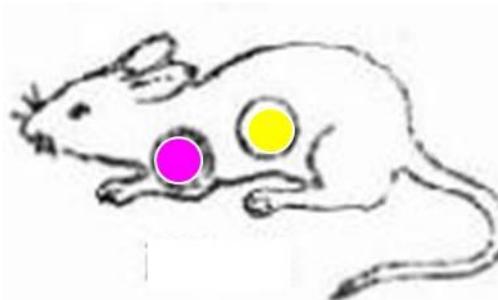
- 苦味酸酒精饱和溶液

黄色（标记，1-9）

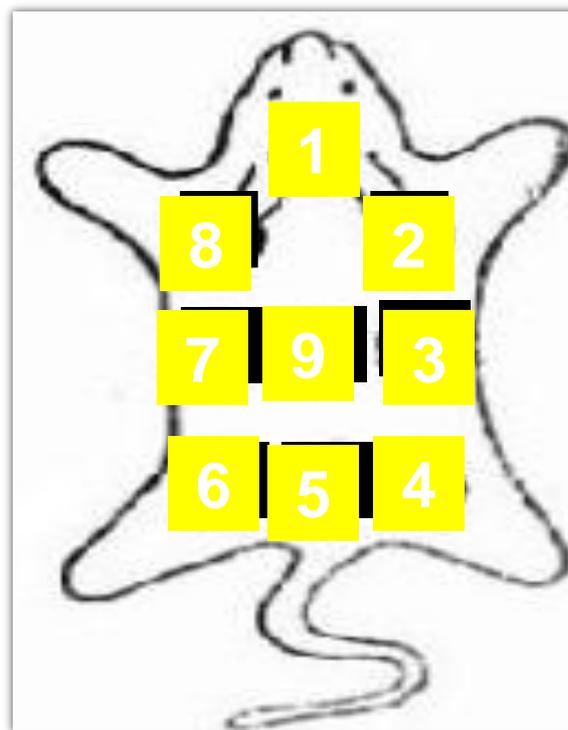
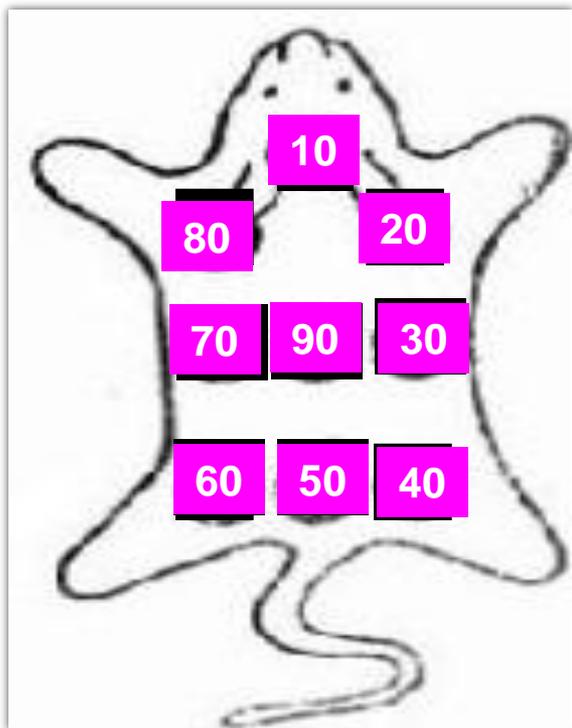
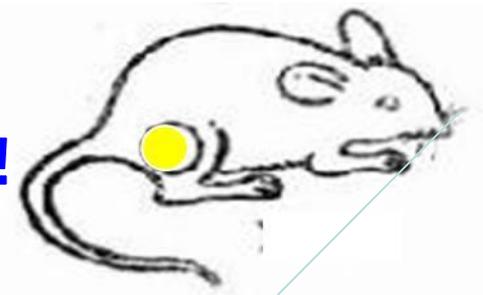
- 0.5%品红溶液

红色（标记，10，20，30…）





位置要准确!!!



受试物溶液的配制

➤ 敌敌畏原液浓度80%



原液浓度为80g/100mL(即800mg/mL)



提示：敌敌畏室温下水中的溶解度约为
 $10\text{g/L}=10\text{mg/mL}$

给药体积 (mL/10g 体重)	最高可给予给药剂量 (mg/kg)
0.1	100
0.2	200
0.3	300
0.4	400



配好的试剂容易分层，灌胃前要彻底混匀。

随机分组

- 称重并记录每只小鼠的体重。
- 通过excel表进行随机分组。

UDP法不需要随机分组，尽可能挑选体重接近的动物进行给药。

学会随机分组的方法，可用于其它毒性实验。



动物给药

- 根据选择的给药体积和每只小鼠的体重计算给药量。
- 根据给药剂量取相应的受试物溶液进行给药。

注意事项

- 注射器吸取液体时，不能有气泡，否则影响剂量的准确性。
- 每个不同剂量的溶液吸完以后，用下一个剂量润洗。
- 注射器的最小刻度，四舍五入后，按实际给药量记录。



中毒症状的观察(重点)

- 动物给药时间，死亡时间
- 仔细观察中毒症状，持续和/或恢复时间。
- 各剂量组动物的死亡数。

症状

1. 管状尾
2. 背部拱起
3. 抽搐
4. 呼吸急促
5. 眼珠变暗
6. 小便失禁
7. 流涎
8. 四肢无力
9. 侧卧
10. 精神萎靡



- 根据动物给药后的毒性反应情况，至少观察10 min后，再确定下一只动物的给药剂量。
- 当选择的剂量有3只动物连续存活时（需排除灌胃操作失误引起的死亡），实验停止。



毒性数据确定

- 根据动物存活的情况，确定在本实验条件下的MTD和MLD。
- 运用AOT425StatPgm软件估算LD50值及其95%的置信区间。



分组安排（每7-8人/组）

取属于各自组动物

称重和标记序号

模拟随机分组

灌胃染毒

观察毒效应

填写实验报告



急性毒性分级及评价

- 根据实验动物的中毒症状、出现死亡的时间和 LD_{50} ，参照我国农药的毒性分级标准，评价受试物的急性毒性大小及毒性特征。

剂量 (mg/kg)	毒性分级
<5	剧毒
5~	高毒
50~	中毒
500~	低毒

实验报告的填写

