



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.10—2014

---

## 化学农药环境安全评价试验准则 第 10 部分：蜜蜂急性毒性试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical  
pesticides—Part 10: Honeybee acute toxicity test

2014-10-10 发布

2015-03-11 实施

---

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局  
中国国家标准化管理委员会 发布

## 前 言

GB/T 31270《化学农药环境安全评价试验准则》分为 21 个部分：

- 第 1 部分：土壤降解试验；
- 第 2 部分：水解试验；
- 第 3 部分：光解试验；
- 第 4 部分：土壤吸附/解吸试验；
- 第 5 部分：土壤淋溶试验；
- 第 6 部分：挥发性试验；
- 第 7 部分：生物富集试验；
- 第 8 部分：水-沉积物系统降解试验；
- 第 9 部分：鸟类急性毒性试验；
- 第 10 部分：蜜蜂急性毒性试验；
- 第 11 部分：家蚕急性毒性试验；
- 第 12 部分：鱼类急性毒性试验；
- 第 13 部分：溞类急性活动抑制试验；
- 第 14 部分：藻类生长抑制试验；
- 第 15 部分：蚯蚓急性毒性试验；
- 第 16 部分：土壤微生物毒性试验；
- 第 17 部分：天敌赤眼蜂急性毒性试验；
- 第 18 部分：天敌两栖类急性毒性试验；
- 第 19 部分：非靶标植物影响试验；
- 第 20 部分：家畜短期饲喂毒性试验；
- 第 21 部分：大型甲壳类生物毒性试验。

本部分是 GB/T 31270 的第 10 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由中华人民共和国农业部提出并归口。

本部分负责起草单位：农业部农药检定所、环保部南京环境科学研究所。

本部分主要起草人：袁善奎、徐晖、瞿唯钢、单正军、卜元卿、严清平、王会利。

# 化学农药环境安全评价试验准则

## 第 10 部分:蜜蜂急性毒性试验

### 1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了蜜蜂急性经口毒性试验和急性接触毒性试验的材料、条件、操作、质量控制、数据处理、试验报告等的基本要求。

本部分适用于为化学农药登记而进行的蜜蜂急性经口毒性试验和急性接触毒性试验,其他类型的农药可参照使用。

本部分不适用于易挥发和难溶解的化学农药。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

#### 2.1

**半致死剂量 median lethal dose**

在急性经口试验或急性接触毒性试验中,引起 50% 的供试生物死亡时供试物剂量,用  $LD_{50}$  表示。

注:单位为  $\mu\text{g a. i./蜂}$ 。

#### 2.2

**供试物 test substance**

试验中需要测试的物质。

#### 2.3

**化学农药 chemical pesticide**

利用化学物质人工合成的农药。其中有些以天然产品中的活性物质为母体,进行仿制、结构改造,创新而成,为仿生合成农药。

同义词:有机合成农药 synthetic organic pesticide。

[NY/T 1667.1—2008,定义 2.3.1]

#### 2.4

**原药 technical material**

在制造过程中得到的有效成分及杂质组成的最终产品,不能含有可见的外来物质和任何添加物,必要时可加入少量的稳定剂。

[NY/T 1667.2—2008,定义 2.5.1]

#### 2.5

**制剂 formulation product**

由农药原药(或母药)和助剂制成使用状态稳定的产品。

[NY/T 1667.2—2008,定义 2.4]

#### 2.6

**有效成分 active ingredient; a. i.**

农药产品中具有生物活性的特定化学结构成分。

[NY/T 1667.2—2008,定义 3.1]

## 2.7

### 参比物质 reference substances

在测试中为证实或否定供试物的某种特性或判断测试系统有效性而使用的化学物质或混合物。

## 3 试验概述

### 3.1 方法概述

蜜蜂急性毒性试验包括急性经口毒性试验方法和蜜蜂急性接触毒性试验方法,根据农药登记管理法规及其他规定选择相关方法进行试验。

### 3.2 急性经口毒性

将不同剂量的供试物分散在蔗糖溶液中,用以饲喂成年工蜂,并对药液的消耗量进行测定,药液消耗完后饲喂不含供试物的蔗糖溶液。在 48 h 的试验期间每天记录蜜蜂的中毒症状及死亡数,并求出 24 h 和 48 h 的  $LD_{50}$  值及 95% 置信限。

### 3.3 急性接触毒性

在蜜蜂被麻醉后,将不同浓度试验药液点滴在试验用蜜蜂的中胸背板处,待溶剂挥发后,将蜜蜂转入试验笼中,用脱脂棉浸泡适量蔗糖水饲喂。在 48 h 的试验期间每天记录蜜蜂的中毒症状及死亡数,并求出 24 h 和 48 h 的  $LD_{50}$  值及 95% 置信限。

## 4 试验方法

### 4.1 材料和条件

#### 4.1.1 供试生物

试验用蜜蜂推荐使用意大利成年工蜂(*Apis mellifera* L.),供试蜜蜂应在清晨或前一日夜晚收集;避免在早春和晚秋季节进行蜜蜂试验,如果在早春和晚秋季节进行试验,要在试验环境下以蜂巢花粉饲喂一周;蜜蜂接受抗生素、抗螨虫药物后四周内不得用于试验。试验蜜蜂要求为健康、大小一致的个体。用于急性经口毒性试验的蜜蜂应在试验前饥饿 2 h。

#### 4.1.2 供试物

农药制剂、原药或纯品。难溶于水的可用少量对蜜蜂毒性小的有机溶剂、乳化剂或分散剂助溶。

#### 4.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 试验蜂笼;
- 电子天平;
- 人工气候室;
- 微量点滴仪;
- 饲喂器等。

#### 4.1.4 试验条件

试验在温度  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50%~70%、黑暗条件下进行。

## 4.2 试验操作

### 4.2.1 急性经口毒性

#### 4.2.1.1 预试验

按正式试验的条件,以较大间距设置4个~5个剂量组,通过预试验求出试验用蜂最高全存活剂量与最低全致死剂量。

#### 4.2.1.2 正式试验

根据预试验确定的浓度范围按一定比例间距(几何级差应控制在2.2以内)设置5个~7个剂量组,每组至少需10只蜜蜂,并设空白对照组,使用有机溶剂助溶的还需设置溶剂对照组。将贮蜂笼内的蜜蜂引入试验笼中,然后在饲喂器(如离心管、注射器等)中加入100  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ 含有不同浓度供试物的50%(质量浓度)蔗糖水溶液,并对每组药液的消耗量进行测定。一旦药液消耗完(通常需要3 h~4 h),将食物容器取出,换用不含供试物的蔗糖水进行饲喂(不限量)。对于一些供试物,在较高试验剂量下,蜜蜂拒绝进食,从而导致食物消耗很少或几乎没有消耗的,最多延长至6 h,并对食物的消耗量进行测定(即测定该处理的食物残存的体积或重量)。对照组及各处理组均设3个重复。观察记录处理24 h、48 h后的中毒症状和死亡数。在对照组的死亡率低于10%的情况下,若处理24 h和48 h后的死亡率差异达到10%以上时,还需将观察时间最多延长至96 h。

#### 4.2.1.3 限度试验

设置上限剂量100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂,即在供试物达100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂时仍未见蜜蜂死亡,则无需继续试验。如供试物溶解度小于100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂,则采用最大溶解度作为上限浓度。

### 4.2.2 急性接触毒性

#### 4.2.2.1 预试验

按正式试验的条件,以较大间距设置4个~5个剂量组,通过预试验求出试验用蜂最高全存活剂量与最低全致死剂量。

#### 4.2.2.2 正式试验

根据预试验确定的剂量范围按一定比例间距(几何级差应控制在2.2以内)设置5个~7个剂量组,每个处理至少需10只蜜蜂。同时设空白对照组及溶剂对照组,对照组及每一剂量组均设3个重复。供试物用丙酮等溶剂溶解,配制成不同浓度的药液。对准蜜蜂中胸背板处,用微量点滴仪分别点滴各浓度供试药液1.0  $\mu\text{L}$ ~2.0  $\mu\text{L}$ ,待蜂身晾干后转入试验笼中,用50%(质量浓度)蔗糖水饲喂。观察记录处理24 h、48 h后的中毒症状和死亡数。在对照组的死亡率低于10%的情况下,若处理24 h和48 h后的死亡率差异达到10%以上时,还需将观察时间最多延长至96 h。

#### 4.2.2.3 限度试验

设置上限剂量100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂,即在供试物达100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂时仍未见蜜蜂死亡,则无需继续试验。如供试物溶解度小于100  $\mu\text{g}$  a.i./蜂,则采用最大溶解度作为上限浓度。

### 4.2.3 参比物质试验

为检验实验室的设备、条件、方法及供试生物的质量是否合乎要求,设置参比物质作方法学上的可

靠性检验。定期(至少6个月一次)进行参比物质急性经口毒性试验和急性接触毒性试验,参比物质推荐为乐果。

### 4.3 数据处理

#### 4.3.1 统计分析方法的选择

可采用寇氏法、直线内插法或概率单位图解法计算每一观察时间(24 h、48 h)的蜜蜂经口毒性和接触毒性的半致死剂量  $LD_{50}$ ,也可采用数据统计软件进行分析和计算。

#### 4.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出蜜蜂在24 h和48 h的  $LD_{50}$  值及95%置信限。  
 $LD_{50}$  的计算见式(1):

$$\log LD_{50} = X_m - i(\sum p - 0.5) \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- $X_m$  ——最高浓度的对数;
- $i$  ——相邻浓度比值的对数;
- $\sum p$  ——各组死亡率的总和(以小数表示)。

95%置信限的计算见式(2):

$$95\% \text{ 置信限} = \log LD_{50} \pm 1.96 S \log LD_{50} \dots\dots\dots(2)$$

标准误的计算见式(3):

$$S \log LD_{50} = i \sqrt{\sum \frac{pq}{n}} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- $p$  ——1个组的死亡率;
- $q$  —— $1-p$ ;
- $n$  ——各浓度组蜜蜂的数量。

#### 4.3.3 直线内插法

采用线性刻度坐标,绘制试验物质浓度对死亡百分率的曲线,求出50%死亡时的  $LD_{50}$  值。

#### 4.3.4 概率单位图解法

用半对数纸,以浓度对数为横坐标、死亡百分率对应的概率单位为纵坐标绘图。将各实测值在图上用目测法画一条相关直线,从直线中读出致死50%的浓度对数,估算出  $LD_{50}$  值。

### 4.4 质量控制

质量控制条件包括:

- 投喂药品及饲养期间,供试物含量不能低于规定含量的80%;
- 试验结束时,对照组死亡率不超过10%;
- 推荐乐果为参比物质,乐果对蜜蜂急性经口试验结果  $LD_{50}$  (24 h)应在  $0.10 \mu\text{g a.i./蜂} \sim 0.35 \mu\text{g a.i./蜂}$  范围之内,乐果对蜜蜂急性接触试验结果  $LD_{50}$  (24 h)应在  $0.10 \mu\text{g a.i./蜂} \sim 0.30 \mu\text{g a.i./蜂}$  范围之内。

## 5 试验报告

试验报告应至少包括下列内容:

- 供试物的信息,包括供试农药的通用名、化学名称、结构式、CAS号、纯度、基本理化性质、来源等;
- 供试生物的名称、来源、大小及饲养情况;
- 试验条件,包括试验温度、试验方法等;
- 试验药液的浓度, $LD_{50}$ (24 h)、 $LD_{50}$ (48 h)值和95%置信限,在对照组的死亡率低于10%的情况下,若处理24 h和48 h后的死亡率差异达到10%以上时,还需将观察时间最多延长至96 h,并给出所采用的计算方法;
- 对照组蜜蜂是否出现死亡及异常反应;
- 观察到的效应,如受试蜜蜂的任何不正常的行为、中毒症状等;
- 对蜜蜂的毒性等级划分参见附录A。

附 录 A  
(资料性附录)  
农药对蜜蜂毒性等级划分

按蜜蜂急性经口和接触的毒性半致死剂量  $LD_{50}$  (48 h), 将农药对蜜蜂的毒性分为四个等级, 见表 A.1。

表 A.1 农药对蜜蜂的毒性等级划分

毒性等级	$LD_{50}$ (48 h)/( $\mu\text{g a. i./蜂}$ )
剧毒	$LD_{50} \leq 0.001$
高毒	$0.001 < LD_{50} \leq 2.0$
中毒	$2.0 < LD_{50} \leq 11.0$
低毒	$LD_{50} > 11.0$



参 考 文 献

- [1] NY/T 1667.1—2008 药登记管理术语 第1部分:基本术语
- [2] NY/T 1667.2—2008 农药登记管理术语 第2部分:产品化学
- [3] EPPO/Council of Europe. (1993). Decision-Making scheme for the environmental risk assessment of plant protection products-honeybee. EPPO bulletin, 23(1):151-165.
- [4] US EPA(2012). Honey bee acute toxicity test(OCSPP 850.3020).Ecological effects test guidelines.
- [5] US EPA(2012). Honey bee acute contact toxicity test(OCSPP 850.3020).Ecological effects test guidelines.
- [6] OECD(1998a) Guideline 213: Honeybees, acute oral toxicity test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [7] OECD(1998b) Guideline 214: Honeybees, acute contact toxicity test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [8] EPPO(2010).Guideline on test methods for evaluation the side-effects of plant protection products on honeybees (N0.170). Bulletin OEPP/EPPO Bulletin,22:203-215.
- [9] 蔡道基. 农药环境毒理学研究. 北京:中国环境科学出版社. 1999.
-