



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 31270.18—2014

---

## 化学农药环境安全评价试验准则 第 18 部分：天敌两栖类急性毒性试验

Test guidelines on environmental safety assessment for chemical pesticides—  
Part 18: Amphibian 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 18 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：周军英、曲薏薏、单正军、田丰、俞瑞鲜、郝身伟、陈朗。

# 化学农药环境安全评价试验准则

## 第 18 部分:天敌两栖类急性毒性试验

### 1 范围

GB/T 31270 的本部分规定了天敌两栖类急性毒性试验的材料、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天敌两栖类急性毒性试验,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

**半致死浓度 median lethal concentration**

在急性毒性试验中,引起 50% 的供试生物死亡时的供试物浓度,用  $LC_{50}$  表示。

注:单位为 mg a.i./L。

#### 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

**半静态试验法 semi-static test**

试验期间每隔一定时间(如 24 h)更换一次药液,以保持试验药液的浓度不低于初始浓度的 80%。

## 2.7

### 静态试验法 static test

试验期间不更换试验药液。

## 2.8

### 流水式试验法 flow-through test

试验期间药液连续更新。

## 3 试验概述

天敌两栖类急性毒性测定方法有静态法、半静态法与流水式试验法三种。应根据供试物的性质采用适宜的方法。分别配制不同浓度的供试物药液,于96 h的试验期间每天观察并记录蝌蚪的中毒症状和死亡数,并求出24 h、48 h、72 h和96 h的 $LC_{50}$ 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

推荐使用泽蛙(*Rana Limnocharis*)或非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)蝌蚪。具体龄期和适宜水温见附录A。如果选用其他两栖类作为试验材料,应该采用能够满足其生理要求的相应驯养和试验条件,并加以说明。

试验用蝌蚪应选用健康无病、龄期一致的蝌蚪。试验前在室内预养3 d,试验前一天停止喂食,试验中亦不喂食。

#### 4.1.2 供试物

农药制剂、原药或纯品。对难溶于水的农药,可用少量对蝌蚪低毒的有机溶剂助溶,用量不得超过0.1 mL(g)/L。

#### 4.1.3 主要仪器设备

主要仪器设备如下:

- 溶解氧测定仪;
- 温度计;
- 酸度计;
- 玻璃缸;
- 量筒等。

#### 4.1.4 试验用水

试验用水为经活性炭处理、存放并曝气处理24 h以上的自来水或能注明配方的稀释水。水质硬度在10 mg/L~250 mg/L之间(以 $CaCO_3$ 计),pH在6.0~8.5之间,溶解氧含量不应低于空气饱和值(ASV)的60%。

#### 4.1.5 承载量

静态和半静态试验系统最大承载量为1.0 g(受试生物)/L,流水式试验系统承载量可高一些。

#### 4.1.6 试验条件

光暗比 16 h : 8 h, 或者自然光照。

#### 4.2 试验操作

##### 4.2.1 方法的选择

应根据供试物的特性选择静态试验法、半静态试验法或流水式试验法。如使用静态或半静态试验法, 应确保试验期间试验药液中供试物浓度不低于初始浓度的 80%。如果在试验期间试验药液中供试物浓度发生超过 20% 的偏离, 则应检测试验药液中供试物的实际浓度并以此计算结果, 或使用流动试验法进行试验, 以稳定试验药液中供试物浓度。

##### 4.2.2 预试验

按正式试验的条件, 以较大的间距设置 4 个~5 个浓度组。通过预试验求出蝌蚪最高全存活浓度和最低全致死浓度。

##### 4.2.3 正式试验

在预试验确定的浓度范围内以一定几何级差(不超过 2.2)设置 5 个~7 个浓度组, 并设一个空白对照组, 使用有机溶剂助溶的增设溶剂对照组, 每个浓度设三个重复。每缸放入 10 只蝌蚪, 试验开始后 6 h 内随时观察并记录试验用蝌蚪的中毒症状及死亡率, 其后于 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察并记录蝌蚪的中毒症状及死亡率, 及时清除死蝌蚪。每天测定并记录试液温度、pH 及溶解氧。

##### 4.2.4 限度试验

设置上限浓度 100 mg a.i./L, 即供试物达 100 mg a.i./L 时供试生物死亡率未超过空白对照组, 则无需继续进行试验。若供试物溶解度小于 100 mg a.i./L, 则采用其溶解度上限作为试验浓度。

#### 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、72 h 和 96 h)的天敌两栖类急性毒性的半致死浓度  $LC_{50}$ , 也可采用数据统计软件进行分析和计算。

##### 4.3.2 寇氏法

用寇氏法可求出天敌两栖类在 24 h、48 h、72 h、和 96 h 的  $LC_{50}$  值及 95% 置信限。

$LC_{50}$  的计算见式(1):

$$\log LC_{50} = X_m - i(\Sigma P - 0.5) \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$X_m$  ——最高浓度的对数;

$i$  ——相邻浓度比值的对数;

$\Sigma P$  ——各组死亡率的总和(以小数表示)。

95% 置信限的计算见式(2):

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

标准误的计算见式(3):

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

式中：

- $p$  —— 1 个组的死亡率；
- $q$  ——  $1-p$ ；
- $n$  —— 各浓度组两栖类的数量。

### 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  $LC_{50}$  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  $LC_{50}$  值。

## 4.4 质量控制

质量控制条件：

- 驯养期间死亡率不得超过 5%；
- 试验期间对照组死亡率不超过 10%，且无异常行为出现；
- 试验期间，试验溶液的溶解氧含量不应低于空气饱和值 (ASV) 的 60%。

## 5 试验报告

试验报告至少应包括下列内容：

- 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；
- 供试生物名称、来源、大小及驯养情况；
- 试验条件，包括试验温度、光照等，所采用稀释水的温度、溶解氧浓度及 pH 等；
- 试验药液的浓度及 24 h、48 h、72 h 和 96 h 的  $LC_{50}$  值和 95% 置信限，并给出所采用的计算方法；
- 对照组蝌蚪是否出现死亡及异常反应；
- 观察到的毒性效应，如受试蝌蚪的任何不正常的行为、中毒症状等；
- 对天敌两栖类的毒性等级划分参见附录 B。

附录 A  
(规范性附录)

供试生物龄期及培养水温要求

试验用蝌蚪的龄期和水温条件参考表 A.1。

表 A.1 试验用蝌蚪的龄期和适宜水温

蛙种	龄期	适宜水温
泽蛙	6 d~10 d (Gosner25 期)	20 ℃~25 ℃
非洲爪蟾	6 d~10 d (NF46~47 期)	21 ℃~23 ℃

附录 B  
(资料性附录)

农药对蝌蚪的急性毒性等级划分

按农药对蝌蚪半致死浓度  $LC_{50}$  (96 h), 将农药对蝌蚪的急性毒性等级分为四级, 见表 B.1。

表 B.1 农药对两栖类的毒性等级划分

毒性等级	$LC_{50}$ (96 h)/(mg a.i./L)
剧毒	$LC_{50} \leq 0.1$
高毒	$0.1 < LC_{50} \leq 1.0$
中毒	$1.0 < LC_{50} \leq 10$
低毒	$LC_{50} > 10$



参 考 文 献

- [1] NY/T 1667.1—2008 农药登记管理术语 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] OECD(2009).Guideline 231: the Amphibian Metamorphosis Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [4] US EPA(1996).Tadpole/Sediment Subchronic Toxicity Test (OPPTS 850.1800).Ecological effects test guidelines.
- [5] ASTM (2007) .Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macr. oinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E729-96.
- [6] OECD(1992).Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test.OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [7] 蔡道基.农药环境毒理学研究.北京:中国环境科学出版社,1999.
-