

《食品毒理学》实验指导书

编者：王新

西北农林科技大学食品科学与工程学院

二〇〇九年五月

实验一 实验动物分组、标记与染毒

一、目的和意义

实验动物的分组、标记和合理染毒，是取得良好实验结果和结论的前提，也是每一个毒理学试验首先做的工作。通过本实验学习试验动物的科学分组、标记和常用基本染毒方法。

二、材料和试剂

- 1、实验动物：成年健康小白鼠
- 2、染料 结晶紫、苦味酸、品红。
- 3、毛笔或棉签
- 4、动物称或天平。

三、实验方法和步骤

（一）健康动物的选择

无论选择哪种种属品系的动物进行实验，均要求选择健康的实验动物。健康动物检查时要求达到：外观体形丰满，被毛浓密有光泽、紧贴体表，眼睛明亮，行动迅速，反应灵活，食欲及营养状况良好。

（二）实验动物性别的鉴定

动物性别不同对毒物的敏感性也不同，这可能与性激素、肝微粒体羟基化反应有关，也随受试物而异。因此，要根据实验要求选择性别，一般实验如对性别无特殊要求者，以选用雌雄动物各半。

1. 大鼠、小鼠主要以肛门与生殖空间的距离区分，间距大者为雄性，小者为雌性。

2. 豚鼠 用一只手抓住豚鼠颈部，另一只手扒开靠生殖器孔的皮肤，雄性动物在圆孔中露出性器官的突出，雌性动物则现出三角形间隙，成年雌性胸部有二个乳头。

3. 家兔

（三）实验动物的抓取方法

1. 小鼠 先用右手抓取鼠尾提起，置于鼠笼或实验台上向后拉，在其向前爬行时，用左手拇指和食指抓住小鼠的两耳和颈部皮肤，将鼠体置于左手心中，把后肢拉直，以无名指按住鼠尾，小指按住后腿即可。

2. 大鼠的抓取方法 基本同小鼠，但因大鼠凶猛，不宜采取袭击方法抓取。为避免咬伤，可带上帆布或棉纱手套。采用左手固定法，用拇指和食指捏住鼠耳，余下三指紧捏鼠背皮肤，置于左掌心中，这样右手可进行各种实验操作。

3. 豚鼠的抓取方法 豚鼠胆小易惊，在抓取时要稳、准、迅速。用手掌迅速扣住鼠背，抓住其肩胛上方，以拇指和食指环握颈部，另一只手托住臀部即可。

4. 兔的抓取方法 用右手抓住兔颈部的毛皮提起，然后左手托住其臀部或腹部，让其体重的大部分重量集中在左手上。

（四）实验动物的随机分组法

- 1、随机数字分组法
- 2、随机区组分组法

(五) 实验动物的编号、标记方法

1. 称重 大、小鼠秤的感应量需在 0.1g 以下。根据实验的不同要求，选择一定数量的大小鼠，体重要求在同一组内、同性别动物体重差异应小于平均体重的 10%，不同组间同性别动物体重均值差异应小于 5%。

2. 编号

(1) 染色法：一般用苦味酸。一般头部为 1，右前腿为 2，右腰为 3，尾基部为 5，左后腿为 6，左腰为 7，左前腿为 8，背部为 9。

(2) 剪耳法

(3) 烙印法

(4) 号牌法

(六) 实验动物染毒途径和方法

1. 皮下注射

2. 皮内注射

3. 肌肉注射

4. 腹腔注射

5. 静脉注射

(1) 兔：常用耳外缘静脉；

(2) 小白鼠：一般为静脉注射（左右二侧的）；

6. 经口染毒：灌胃，胶囊，自由采食。

7. 其他途径给药：

(1) 呼吸道染毒

(2) 皮肤染毒：a. 斑贴法；b. 浸尾法

实验二 实验动物生物材料采集和制备

一、目的与意义

研究外来化合物的毒性效应。常需测定动物接触外来化合物后，血液、尿液和组织中的化合物或其代谢产物的浓度，以及分析测定化合物所致的生物化学的变化。为此，采集和制备生物材料就成为食品毒理学的重要基础技术之一。

本实验主要学习食品毒理学试验中常用生物材料的采集和制备方法。

二、内容

- 1、实验动物大鼠、小鼠和家兔的采血方法。
- 2、实验动物血清与细胞分离技术。
- 3、大鼠尿液收集方法。
- 4、脑或肝组织匀浆制备技术。

三、试剂和材料

(一) 实验动物：成年小鼠、大鼠和家兔。

(二) 器材

- 1、家兔盒，兔固定架，大小鼠固定板。
- 2、解剖器材 大剪刀，镊子，儿科小骨钳。
- 3、其他器材 离心管(2-10ml)，玻璃毛细管(内径 1-1.5ml)，注射器 (1, 2, 5 和 10ml) 及相应针头，吸管 (5-10ml)，滴管，匀浆机，培养皿 (直径 5-10ml)。
- 4、仪器设备 离心机(4000r/min)，搅拌机(2000r/min)，大小鼠代谢笼。动物称，电子天平。

(三) 试剂

- 1、抗凝剂 0.5%肝素生理盐水溶液。
- 2、生理盐水或 PBS 缓冲液。

(四) 其他

碘酒、酒精棉球、滤纸。

四、操作步骤

(一) 血液的采集

1、大鼠与小鼠的采血方法：

① 鼠尾采血：当所需血量很少时采用本法。固定动物并露出鼠尾，将尾部浸入 45~50℃温水中数分钟，使尾静脉充血，擦干，再用酒精棉球擦试消毒。剪掉尾尖 (约 0.2~0.3cm)，拭去第一滴血。然后用血色素吸管定量吸取尾血，或将尾血直接滴入容器内。采血完毕用干棉球压迫止血。亦可不剪尾，用 7~8 号注射针头连上注射器直接刺破尾静脉采血。

② 眼眶静脉丛采血：当需用中等量的血液，而又避免动物死亡时采用本法。左手拇指及食指紧紧握住大鼠或小鼠颈部，压迫颈部两侧使眶后静脉丛充血，但用力要恰当，防止动物窒息死亡。右手持玻璃毛细管从右眼或左眼内眦部以 45° 角刺入，刺入深度小鼠约 2~3mm，大鼠 4~5mm。若遇阻力稍后退调整角度后再刺入，如穿刺适当，血液能自然流入毛细管内。得到所需的血量后，即除去加于颈部的压力，拔出毛细管，用干棉球压迫止血。

③ 断头采血：当需用大量的血液，而又不需继续保存动物生命时采用本法。左手握住动物，右手持剪刀，快速剪掉头颈部，倒立动物让血液滴入容器。需注意防止断毛落入容器中。

2、家兔采血方法：

① 耳缘静脉采血：本法为最常用的取血方法之一，可多次反复取血。将家兔固定于兔箱中，拔掉拟采血耳缘部细毛，用手指轻轻弹耳或电灯照射兔耳，使耳部血管扩张，然后消毒。左手压迫耳根，用针头刺破静脉或以刀片在血管上切一小口，让血液自然流出。也可直接用注射器进针耳缘静脉抽取血液。采血完毕用干棉球压迫止血，如一时不易止血，可用木夹夹住耳壳 10~20 分钟。

② 心脏穿刺采血：将家兔仰卧位固定在兔台上或由助手捉持，在左胸第 2~4 肋部剪毛，常规消毒。于第 3~4 肋胸骨左缘心跳最明显处穿刺，针头刺入心脏后即见血液涌入注射器。采血完毕迅速将针头拔出，这样心肌上的穿刺孔较易闭合，针眼处用酒精棉球压迫止血。体重 2 公斤的家兔每隔 2~3 周可重复采血 10~20ml。

③股动脉采血：将家兔仰卧固定在兔台上，左手拉直动物后肢，右手持注射器，以血管搏动为指标，将针头刺入股动脉。若已刺入动脉，即有鲜红色血液流入注射器。抽血完毕迅速拔出针头，用干棉球压迫止血。

3、狗的采血方法：

① 后肢外侧小隐静脉和前肢皮下头静脉采血：本法最常用，且方便。后肢外侧小隐静脉位于后肢胫部下 1/3 的外侧浅表的皮下，由前侧走向后上侧，前肢皮下头静脉位于前肢脚爪上方背侧的正前方。抽血前，将狗固定在狗台上或使狗侧卧，由助手固定好。剪去抽血部位的毛，常规消毒。一人用力压迫静脉近心端或用止血带绑紧，使静脉充盈，另一人持注射器进行静脉穿刺。取得所需血量后拔出针头，以干棉球压迫止血。

②耳缘静脉采血：当需少量血液或作血常规检查时，可用狗的耳缘静脉采血法。剪毛后先将狗的耳壳加热，或用二甲苯棉球擦耳壳，然后以刀片切割已扩张的血管，使血液滴入容器。采血完毕，以干棉球压迫切割口以止血。

4、采集血液的注意点：

① 实验动物一次采血量过多或采血过于频繁，都可影响动物健康，造成贫血甚至死亡，其最大安全采血量见表 1。

② 采血方法的选择，主要取决于实验的目的和所需血量的多少，所需血量较少时可刺破组织取毛细血管的血，当需血量较多时可作静脉采血，若需反复多次静脉采血时，应自远心端开始。

③ 若需抗凝全血，在注射器或试管内需预先加入抗凝剂，常用的抗凝剂有：

A、草酸钾：常用于供检验用血液样品的抗凝。在试管内加饱和草酸钾溶液 2 滴，均匀浸湿管壁后，放入烘箱（80℃）烤干，包好备用。每管能使 3~5ml 血液不凝固，供钾、钙含量测定的血样不能用草酸钾抗凝。

B、肝素：取 1%肝素溶液 0.1ml 于试管内，均匀浸湿试管内壁，放入烘箱（80~100℃）中烤干。每管能使 5~10ml 血液不凝固。市售的肝素注射液每 ml 含肝素 12.500 U，相当于肝素钠 125mg。

C、枸橼酸钠：3.8%的枸橼酸钠溶液 1 份可使 9 份血液不凝固，用于红细胞沉降速率测定。因其抗凝作用较弱而碱性较强，不适用于供化验用的血液样品。

（二）血清与细胞分离

1、制备血清 将全血置于 4℃冰箱中保存 3—4h，以 1500—2000r/min 离心 15min。上清液呈淡黄色即为血清，吸出备用；如上清液呈淡红色（甚至红色），表明有溶血，一般应废弃。

2、细胞分离 分离血细胞时，采血所有器皿均先行抗凝剂处理。即先将抗凝剂吸入所有器具中，使在器壁上均匀涂布。采血时使抗凝剂溶于血中，并混匀。2000r/min 离心 20min，吸出上清血浆。血浆与红细胞之间白细胞，需要时，把白细胞转入到另外离心管，不需要则废弃。离心管所留的红细胞，加入等体积的生理盐水，轻轻混匀红细胞，再次离心，弃去上清液。如此洗涤 3 次，直至上清液为无色透明为此，即获得红细胞。白细胞可依相同洗涤处理。

（三）尿液的收集

1、一次尿收集法：在实验研究中，有时为了某种实验目的，要求每间隔一定的时间收集一次尿液，如每 4 小时收集一次，以观察药物的排泄情况。此种情况下，常用以下方法收集尿液。

①逼尿法：本法适用于兔、猫。助手把动物抱住，操作者右手由腹腔向下逐渐用力压迫膀胱，逼出尿液。

②导尿法：本法适用于兔、猫、猴和狗等动物，是较常用的方法之一。动物取仰卧位固定于手术台上，尿道口常规消毒。以左手充分暴露尿道口且固定之，右手持导尿管（尖端涂有消毒凡士林或液体石蜡）顺尿道轻而慢地插入，家兔插入约 8~12cm，一旦进入膀胱腔，即见尿液流出。若无尿流出，可将导尿管适当上下左右移动，到尿液流出为止，然后用胶布将导尿管与动物体固定。

③输尿管插管法：本法适用于兔、猫、猴和狗。以兔为例：将兔麻醉后仰卧位固定在手术台上，于耻骨联合上缘沿正中腹白线作一 4~6cm 的切口，打开腹腔，在膀胱底两侧找出左右两根输尿管，分离后于两根输尿管下各穿两根线，一根结扎近膀胱端，在结扎线上方肾脏方

向剪一小口插入导管，用另一线结扎。将两根导管的游离端一并放入量筒内收集尿液。实验过程中，应用温生理盐水纱布覆盖手术野，以保持腹腔温度。

2、连续收集尿液的方法

大鼠和小鼠的留尿法：在小动物的毒理实验中，常常收集 24 小时或某特定时间内的尿液。为此常用代谢笼配上粪尿分离漏斗收集尿液，此装置除支架外均用玻璃或有机玻璃制成，便于清洗。该装置主要包括圆形有机玻璃笼罩，带孔的圆玻璃底盘，供饮水和食料的装置，锥形集尿漏斗和粪尿分离器等。动物置于代谢笼内，粪尿分离漏斗的侧口接一只 150~200ml 的集尿容器收集尿液。

一般 5~6 小时内，平均每只小鼠可收集到 0.4~0.5ml 的尿液。如留尿前给予灌胃，每克体重灌液 0.02ml，则可增至 0.7~0.8ml。未经水负荷的正常大鼠，排尿量约为 0.5ml/100g 体重/小时。

猫和兔连续集尿装置的组成部分与大鼠的基本相同。但代谢笼常用铁丝和搪瓷制成。集尿的容器要大一些。

3、收集尿液的注意点

① 尿液收集器必须保证粪尿分开，防止粪便污染尿液。标本容器务须洁净，其容量视动物而定。

② 标本收集后，须在新鲜时进行检验，若需放置时间较长，则须贮放在冰箱或加入适当的防腐剂。

③ 分析尿中金属离子时，代谢笼等应避免用金属材料制成，集尿容器最好用聚乙烯材料的。

④ 为了满足实验所需尿量，在收集尿液前，可灌喂适量的水及青菜。

（四）实验动物组织匀浆的制备

动物处死后，立即取出所需组织，置于干冰内备用。或置于冰块上，轻轻除去表面的凝血及结蒂组织等附属物，再经冰冷生理盐水洗涤几次，用滤纸吸干水份，称取一定重量的组织备用。如有特殊需要或短期保存，应放入液氮中或冰箱冻结。

将已剥离处理好的脏器定量置于匀浆器中，按设计要求加入一定比例的溶液。以肝组织匀浆为例，称取 1 克重的肝组织，在表面皿内剪碎后，以 1:9（1 份肝组织加 9 份 0.155M KCl 溶液）在匀浆器中稀释，用电动搅拌器以 3,000 转/分的转速研磨 2~3 分钟。再经 3,000 转/分的转速，在 4℃ 中离心 10~15 分钟。取上清液即可测定肝组织匀浆的酶活力（GPT 或 GOT）。

当制备组织药物萃取的组织匀浆时，基本方法同上，但匀浆的操作不一定在冷冻条件下进行。组织块与适宜比例的无离子水研磨成匀浆后，匀浆不必离心。但有时需水解，使结合的药物变成游离状态，再加入萃取用的有机溶剂，振荡、抽提，使药物或代谢产物萃取入有机溶剂内，从而达到与组织分离的目的。

实验三 急性毒性试验（改进寇氏法）

一、目的与要求

1、学习化学物急性毒性试验设计，掌握 LD₅₀ 的测定方法。

2、观察辛硫磷的毒性反应。

二、实验原理

急性毒性试验是指受试动物在一次大剂量给药后所产生的毒性反应和死亡情况。药物毒性的大小，常用动物的致死量来表示，因为动物生与死的生理指标较其他指标明显、客观、容易掌握。致死量的测定也较准确。在测定致死量的同时，还应仔细观察动物是否出现耸毛、倦卧、耳壳苍白或充血、突眼、步履蹒跚、肌肉瘫痪、呼吸困难、昏迷、惊厥、大小便失禁等不良反应。

致死量的测定常以半数致死量为标准。半数致死量是指能够引起试验动物一半死亡的剂量，用符号 LD₅₀ 表示。由于 LD₅₀ 的测定较简便、可靠，而且稳定，

现已成为标志动物急性中毒程度的重要常数。LD50 测定的方法有多种，如 Bliss 法、改进寇氏法、简化机率单位法、累积插值法、机率单位-加权直线加归法等等。以上方法虽各有特点，但都有共同的要求：

(1) 动物：均选用体重 17~22 克健康小鼠（同次试验体重相差不得超过 4 克），或选用体重 120~150 克（同次试验体重相差不得超过 10 克）健康大鼠作实验动物。性别相同或雌雄各半。

(2) 给药途径：尽量使受试动物与人对受试物的实际接触途径相一致。食品毒理学一般选用经口途径。主要采用灌胃。

(3) 试验周期和观察指标：给药后至少观察 7 天。观察期间应逐日记录动物的毒性反应情况和死亡动物的分布。

(4) 正式试验前，均须先用少量动物进行预试试验，大致测出受试药物引起 0% 和 100% 死亡率的致死量范围，然后安排正式试验。正式试验组数不得少于三个剂量组，一般选用 4~5 个剂量组，每组动物数为 10~20 只。

(5) 报告 LD50 时需注明实验动物的种属及品系、性别、体重范围、给药途径及每个剂量组动物数等，还需注明受试药物的配制方法、给药剂量、各组剂量间的比值（一般以 0.65~0.85 为宜）、给药容积、观察时间及计算方法。还须标出 LD50 的 95% 可信限。

三、实验材料和试剂

动物：小鼠

药品：辛硫磷

器材：注射器、灌胃针头、鼠笼

四、操作方法

1、预试实验：预试实验目的是为了找出引起动物 0% (Dn) 和 100% (Dm) 死亡的剂量，以便安排正式实验。预试实验一般采用少量动物（6~9 只小鼠）进行，将动物随机分为 3 组，组间剂量比值一般以 1: 0.5 或 1: 0.7 为宜。灌服或腹腔注射量以 0.2ml/10g 体重为度。预试实验应进行到找出 Dn 和 Dm 后方可安排正式实验。

2、正式实验：在预试实验测得 Dn 和 Dm 的剂量范围内设 4~6 个剂量组，最多 10 组。最理想的结果是使 LD₅₀ 的上下各有 2~3 组。组数愈少，准确性愈差。各剂量组的动物要求相等，至少 10 只动物（分组时应注意分层随机均匀化的原则）。本实验要求最大反应率为 100%，最小反应率为 0%，或至少反应率接近 100% 或 0%。组间剂量比值 (1: K)，常用 1: 0.8 或 1: 0.75。如实验中出现相邻剂量有重复的 100% 和 0% 反应率时，应将靠边的组弃去不计，使大剂量组只有一个 100% 的反应率，小剂量组也只有一个 0% 的反应率。

分组完毕和各组剂量算出后，分组灌服或注射不同剂量的受试药物。为能得到理想的结果，实验最好从中间剂量开始，以便从最初几个剂量组动物接受药物后的反应来判断两端剂量是否合适，便于调整剂量和组数。为了提高实验的精确度和节省药物，受试药物可按“低比稀释法”配置。即使每只动物的用药体积相等 (0.2ml/10g)，而溶质不等。给药后逐日观察并记录中毒反应、死亡率和死亡情况。

五、实验结果记录与计算辛硫磷对小鼠死亡率的影响

辛硫磷对小鼠死亡率的影响

组别	剂量 g/kg (d)	Logd (X)	死亡数	死亡率 (P)	P ²	P-P ²
1						
2						

3

4

公式 1: LD₅₀ 值计算 $\lg LD_{50} = X_m - i(\Sigma P - 0.5)$

公式 2: lgLD₅₀ 标准误 $S_{\lg LD_{50}}$

$$S_{\lg LD_{50}} = ix \sqrt{\frac{\Sigma Pq}{n}}$$

公式 3: LD₅₀ 的 95%可信限 = $\lg^{-1} (\lg LD_{50} \pm 1.96 \times S_{\lg LD_{50}})$

LD₅₀ 的平均可信限 = $LD_{50} \pm (LD_{50} \text{ 高限} - LD_{50} \text{ 低限}) / 2$

X_m: 最大剂量组剂量的对数值

i: 相邻两组剂量 (d) 对数值之差, 或相邻两组高剂量与低剂量之比的对数。

P: 各组动物的死亡率, 用小数表示。

ΣP: 为各组动物死亡率的总和。

n: 每组动物数。

S_{lgLD₅₀}: logLD₅₀ 的标准误。