



中华人民共和国国家标准

GB/T 21804—2008

化学品 急性经口毒性固定剂量试验方法

Chemicals—Test method of acute oral toxicity-fixed dosed procedure

2008-05-12 发布

2008-09-01 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

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
化 学 品
急性经口毒性固定剂量试验方法
GB/T 21804—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 22 千字
2008年7月第一版 2008年7月第一次印刷

*

书号: 155066·1-32212 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 21804—2008

前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南 NO. 420(2001 年)《急性经口毒性：固定剂量法》(英文版)

本标准作了下列编辑性修改：

- 增加了范围部分；
- 增加了前言和 OECD 引言部分；
- 计量单位改成我国法定的计量单位；
- 删除 OECD 的参考文献部分。

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 为规范性附录。

本标准由全国危险化学品管理标准化技术委员会(SAC/TC 251)提出并归口。

本标准负责起草单位：天津市检验检疫科学技术研究院。

本标准主要起草人：王利兵、张园、于智睿、李学洋、赵琢、王华。

OECD 引言

1. OECD 化学品试验指南随着科学的进步和实践操作标准的改变而进行周期性的修订。最早的 OECD 420 于 1992 年 7 月发布作为 OECD 401(常规的急性经口毒性试验)的第一备选方案。基于多次专家会议的建议,认为本标准应该进行修订,原因如下:1)用 LD_{50} 值代替 1992 年推荐的临界值作为化学物质分类的标准已经达成广泛的共识,2)认为单一性别动物(通常用雌性)试验的结果是可信的。

2. 传统的急性经口毒性鉴定方法是以动物死亡作为毒性终点。1984 年英国毒理学会(BTS)根据固定剂量法提出一种新的急性毒性测试方法。此种方法可以避免以动物死亡作为毒性终点,而是观察一系列不同的固定剂量中所出现的明显毒性反应。通过英国和世界范围内的体内验证实验,该方法于 1992 年被理事会采纳为试验指南。接下来,通过一系列试验利用数学模型评价了固定剂量法的统计学意义。体内实验和模型研究共同证明了该方法可重复性好,与传统方法相比可以节省动物,使动物遭受较少的痛苦;此方法与其他急性毒性方法(方法指南 423 和 425)一样能对物质进行毒性划分。

3. 在急性经口毒性的指导性文件中提供了如何根据特定的实验目的选择最合适的试验方法的指导,这个指导性文件同时提供了关于 420 的实施和解释。

4. 固定剂量法的原则,在正式试验中只选用中等毒性剂量,不选用致死剂量,也不选择由腐蚀或严重刺激作用引起的或已知会产生明显疼痛或痛苦的染毒剂量。如果发现濒死动物或动物出现明显的疼痛或严重痛苦的症状时,从人道原则出发将其处死,在结果解释时,这些处死的动物应同试验中死亡的动物一样进行解释。指南文件中有专门的部分关于如何判断动物濒死和遭受巨大痛苦和是否应该处死这些动物的标准。

5. 该方法用于提供物质有害属性的信息,使得该物质可以按照 GHS 对化学物质急性毒性划分的标准进行分类定级。

6. 在试验进行前需要收集受试物的所有相关信息。包括物质的标准分类和化学结构;理化性质;有关该物质的各种体内和体外毒理试验结果;与该物质结构相似物质的毒性数据和该物质预期的用途。这些信息是保护人类健康的一类试验所必须收集的信息,并有助于选择合适的起始剂量。

化学品

急性经口毒性固定剂量试验方法

1 范围

本标准规定了化学品急性经口毒性固定剂量试验的范围、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于化学品的急性经口毒性测定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

急性经口毒性 acute oral toxicity

将受试物在 24 h 内给试验动物进行一次经口或多次经口染毒时所产生的有害效应。

2.2

延迟死亡 delayed death

48 h 内动物未发生死亡,而死亡发生在 14 天观察期内。

2.3

剂量 dose

所受受试物的量,常以质量(g、mg)或动物单位体重所给予的受试物的量(mg/kg)来表示;如将受试物掺入饲料进行喂养染毒时,也可以用受试物在饲料中的恒定浓度(mg/kg)来表示。

2.4

明显毒性 evident toxicity

给予受试样品后出现的明确的毒作用表现,可作为危险度评价的充分证据,预期随染毒剂量的增加可发展为严重的中毒症状直至死亡。

2.5

化学品分类及标记全球协调制度(GHS) globally harmonised classification system for chemical substance and mixture

是经合组织(OECD)中人类健康和环境部分,联合国危险品运输规范中的理化性质内容和国际劳工组织(ILO)中有关危险品运输部分的结合,并与化学品有效管理机构间规划组织(IOMC)协调一致。

2.6

临近死亡 impending death

如果预测到在下一个要做的剂量的观察期间会发生动物濒死或死亡。啮齿类动物处于临近死亡状态的表现有抽搐、侧卧、躺卧和震颤。

2.7

半数致死口服剂量 median lethal oral dose; LD₅₀

是通过统计学推断出来的能够导致经口染毒动物一半死亡的一次染毒剂量。LD₅₀值的表示方法为(mg/kg),即每公斤体重的受试物染毒剂量。

2.8

限量试验 limit dose

在最高剂量上进行试验(2 000 mg/kg 或 5 000 mg/kg)。

2.9

濒死状态 moribund status

处于临死或经过治疗也不能存活的状态。

2.10

可预测的死亡 predicatable death

通过临床表现可以预测在试验结束之前的某个时候会发生死亡,如不能饮食或进食。

3 试验基本原则

试验中各组选用同性别(一般选用雌性)动物,以固定的剂量间距(5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg 和 2 000 mg/kg,如有特殊需要再考虑 5 000 mg/kg)顺次进行经口染毒。起始剂量是依照预试验的结果确定的,是能够产生毒性反应但不产生严重的毒性反应或死亡的剂量。根据毒性反应和死亡的有无来确定是否在更高剂量或更低剂量继续做试验。出现下列情况结束试验:1)当出现明显的毒性反应或已确认不多于一只动物死亡;2)最高剂量未出现毒性反应;3)最低剂量动物出现死亡。

4 试验方法

4.1 实验动物

4.1.1 动物的选择

大鼠为首选。鼠龄为8周~12周。试验动物体重变异不应超过平均体重的20%。常用体重范围:大鼠为180 g~240 g,小鼠为18 g~25 g。雌性动物应该是未怀孕或生产过。在缺乏构效关系或无提示雄性更为敏感性别动物的前提下,一般选用雌性动物进行试验。

4.1.2 饲养环境和条件

动物房的室温控制在22℃±3℃,相对湿度为30%~70%(清洁时应达到50%~60%)。饲养室内宜采用人工光源,应保持12 h明、12 h暗。动物食用标准饲料自由饮水。每个剂量组分笼饲养。每笼子动物数以不干扰活动及不影响观察为度。

4.1.3 动物的准备

试验前要对动物进行标记,用于个体识别。试验前动物要在试验环境中至少适应5 d。

4.2 受试物

4.2.1 受试物准备

4.2.1.1 一般试验中,受试物染毒时需要固定染毒体积(通过配置不同浓度的受试物溶液实现)。一般使用液体或者液状混合物染毒,但是如果使用未加稀释的受试物(恒定浓度),则后期需要进行相关的危险度评价并需要相应的管理。

4.2.1.2 一般情况下不能超过最大的染毒体积。每次能染毒的最大体积取决于实验动物的大小。对于啮齿类动物,一般染毒体积不超过1 mL/100 g,但是对于液体溶液也可以考虑2 mL/100 g。

4.2.1.3 应使用液体溶液/悬浮液/乳化液助溶(如植物油),或使用其他增加溶解度的方法。需要了解助溶剂的毒性。

4.2.1.4 溶液一般需要新鲜配置,除非有证据表明受试物溶液具有较好的稳定性,放置一阵时间后结果不受影响。

4.3 染毒

4.3.1 染毒方式和时间

通过胃管或合适的插管灌胃一次性染毒,如果不能够一次染毒,则一次给一部分,但整体染毒时间不能超过 24 h。

4.3.2 禁食

染毒前动物需要禁食(大鼠禁食不禁水过夜;小鼠禁食不禁水 3 h~4 h)。禁食后染毒前需要对动物进行称重。染毒后仍需继续禁食(大鼠 3 h~4 h,小鼠 1 h~2 h)。如果染毒是在一个时期内完成的,则应该给动物提供水和食物,这取决于禁食时间的长短。

4.4 预试验

4.4.1 起始剂量

根据相关的毒理学资料从 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg 和 2 000 mg/kg 中选择一个作为起始剂量。如果无相关的毒理学资料一般以 300 mg/kg 作为起始剂量。如果无明确的资料可以证明急性毒性试验对人类、动物健康和环境保护有重大意义,出于动物福利的考虑,应不做 5 000 mg/kg,具体可以参照附录 C。

4.4.2 染毒步骤

每次取一只动物,按照附录 A 进行预试验,仔细观察并记录染毒后动物的毒性表现,间隔 24 h 后,再给另一只动物染毒。所有试验动物至少观察 14 d。

4.4.3 结果解释

4.4.3.1 一般结果

预试验结果为正式试验提供起始剂量。

4.4.3.2 附加程序

预试验中,如果在最低剂量(5 mg/kg)试验动物发生死亡,根据试验程序,应停止试验,将该物质划为 GHS 急性毒性,危险类别为 1 类(见附录 A)。但为了获取更为确证的试验结果,应选取第二只试验动物按照 5 mg/kg 染毒,如果第二只动物死亡,结束试验,该物质划为 GHS 急性毒性,危险类别为 1 类;如果该动物无死亡,最多再选 3 只顺序按 5 mg/kg 染毒。出于动物福利的考虑,应一只一只动物顺序试验,观察间隔为确定上一只动物已经存活。只要有第二只动物死亡则试验结束(此时已经可以按照附录 B 进行分级)。

4.5 正式试验

4.5.1 剂量选择

从预试验中选取只产生明显毒性而不引起死亡的剂量作为正式试验起始剂量。如果在正式试验时选择的起始剂量未见明显毒性,应接着进行下一个较高剂量的染毒。如果在正式试验时选择的起始剂量中试验动物死亡或严重毒性反应时,应从保护动物免受痛苦出发,选择下一个较低剂量进行试验。

4.5.2 动物数量

每个剂量组 5 只,5 只动物应包含预试验中该剂量组使用的一只动物(除非正式试验所选用的剂量未做预试验)。

4.5.3 染毒步骤

4.5.3.1 一般程序

在预试验所得结果的基础上,遵照附录 B 的程序进行染毒。

4.5.3.2 染毒时间间隔

应在确定前一剂量组的动物存活后,才可进行下一剂量的试验。一般两个剂量组试验之间要间隔 3 d~4 d,以有助于更好地观察迟发的毒性反应。间隔时间可以根据实际情况进行调整。

4.5.3.3 如果要做 5 000 mg/kg 的剂量,要遵从附录 C 的要求。

4.5.4 限量试验

4.5.4.1 要求

如果有相关的资料表明受试物可能无毒(如只在限制值以上表现出毒性),可以进行限量试验。受试物的毒性资料可以通过其类似化合物或类似混合物(根据性质和所占的比例判断受试物所占的毒性重要性)的毒性资料获得。如无确切的证据表明该物质无毒,或者预计该受试物有毒,就不能进行限量试验。

4.5.4.2 程序

按照一般程序,染毒剂量为 2 000 mg/kg(5 000 mg/kg),选取另外 4 只动物进行试验。

4.6 临床观察和检查

4.6.1 观察频率和期限

在给动物染毒的当天应该在染毒后的 30 min 和 4 h 各做一次仔细的临床观察,以后每天一次。除非动物过度痛苦需及时处死外,一般在染毒后应对动物观察 14 d。观察期一般取决于毒性反应、发生体征的快慢和恢复时间的长短。如果中毒体征有迟发性倾向时,应延长观察期。如果动物持续表现出毒性则需要附加的观察。

4.6.2 观察内容

4.6.2.1 体重

应在染毒后称重每只动物。以后至少每周一次,并做好体重记录,计算体重变化。试验结束时应对存活动物进行称重,然后进行人道主义处死。

4.6.2.2 大体观察

观察应该包括皮肤,被毛,眼睛和黏膜变化,也应观察呼吸,循环,植物神经和中枢神经系统的体征,肢体活动状况及行为变化。如果动物出现震颤、抽搐、腹泻、流涎、嗜睡和昏迷的情况时应该特别注意。应该参考人类临终指导中的原则和标准,对处于濒死状态、出现明显疼痛或严重痛苦表现的动物应实施人道主义处死。当因人道原因处死动物或发现死亡时,因该尽可能准确记录死亡时间。

4.7 病理组织学检查

应对全部染毒动物(包括试验期间死亡的或因人道原因处死的动物)进行大体解剖;记录全部肉眼可见的病损。染毒后存活 24 h 以上的动物中出现明显肉眼所见病损的器官应作病理组织学检查。

5 试验数据与报告

5.1 数据

应该提供每一只动物的资料。按各剂量水平将染毒动物的观察结果以表格形式进行总结;描述使用的动物数目;出现中毒体征的动物数;试验中引起死亡或处于人道主义处死的动物数,每只动物的死亡时间;描述毒性反应及恢复的时间及大体解剖的结果。

5.2 试验报告

试验报告应包括预备试验和正式试验所得的下述资料:

5.2.1 受试物

- 物理性状、纯度和相关的理化性质(包括异构体);
- 名称和识别码如 CAS 编号;
- 助溶剂(如果试验中用到);
- 如果助溶剂不是用水,则需要对助溶剂进行评价。

5.2.2 试验动物

- 动物的品系;
- 微生物学性状;
- 动物数目、年龄和性别(是否使用了雄性动物替代了雌性动物);
- 动物来源、饲养条件及饲料等。

5.2.3 试验条件

- 受试物成分的详细信息,包括染毒时的剂型;
- 染毒的剂量和时间;
- 饲料和饮水的质量(饲料的类型/来源、水的来源);
- 起始剂量的选择。

5.2.4 结果

- 制作记录不同剂量水平每只动物的数据的表格(例如,动物出现毒性反应性质,轻重程度和毒效应,持续时间);
- 制表记录动物体重和体重变化的表格;
- 染毒后动物的体重,以后每周一次,直到动物死亡或试验结束时被处死;
- 如果在动物宰杀之前动物死亡,记录死亡日期和时间;
- 出现毒性反应的时间和持续时间,每只动物是否恢复;
- 每只动物大体解剖的结果,如果有需要还应该包括组织学结果。

5.2.5 结果的讨论和解释

5.2.6 结论



附录 A
(规范性附录)
预试验流程

A.1 预试验流程图(见图 A.1~图 A.4)

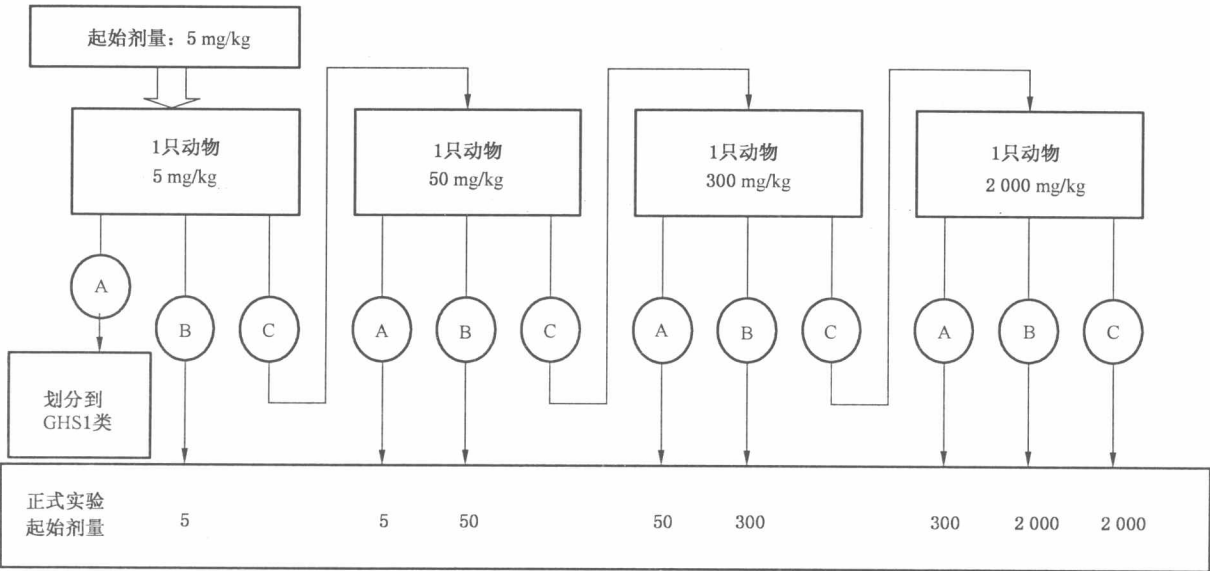


图 A.1 预试验流程图(起始剂量:5 mg/kg)

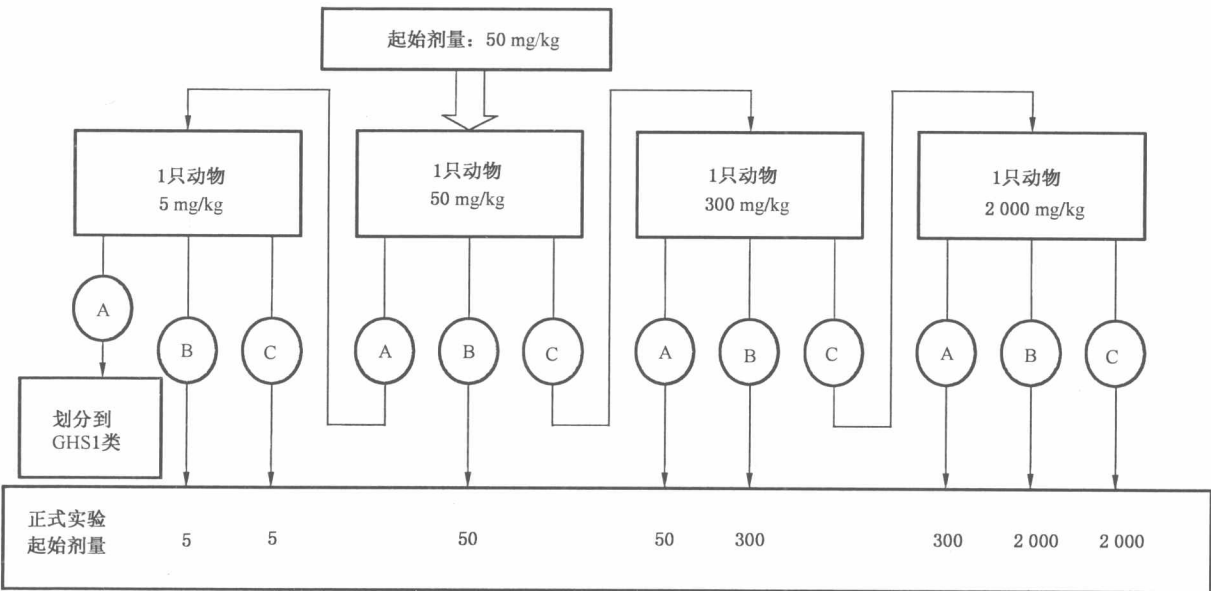


图 A.2 预试验流程图(起始剂量:50 mg/kg)

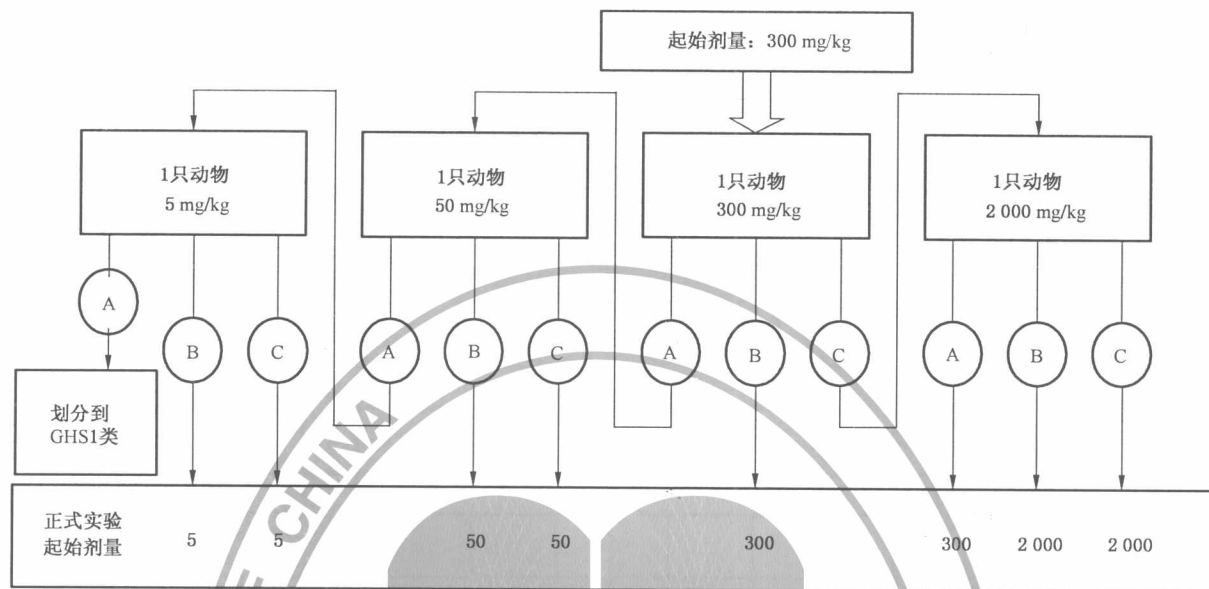


图 A.3 预试验流程图(起始剂量:300 mg/kg)

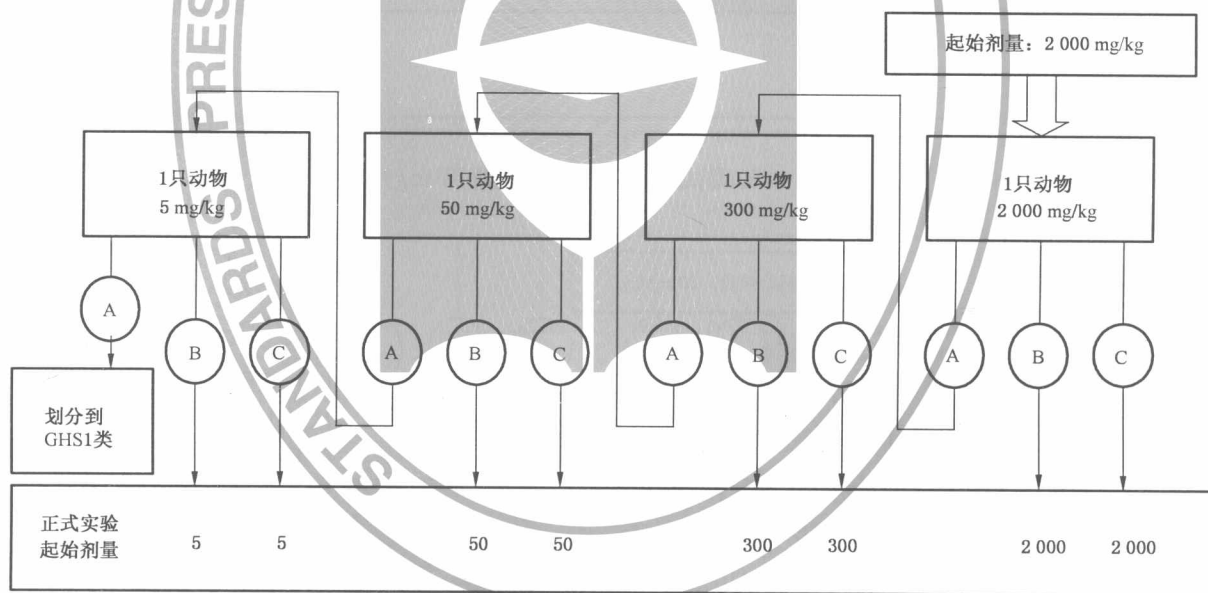


图 A.4 预试验流程图(起始剂量:2 000 mg/kg)

注：A——死亡；B——明显毒性；C——无毒性。如在 5 mg/kg 剂量下出现结果 A，应按照 4.4.3.2 附加程序方法划分该物质的 GHS 急性毒性危险类别。

附录 B
(规范性附录)
正式试验流程

B.1 正式试验流程图(见图 B.1~图 B.4)

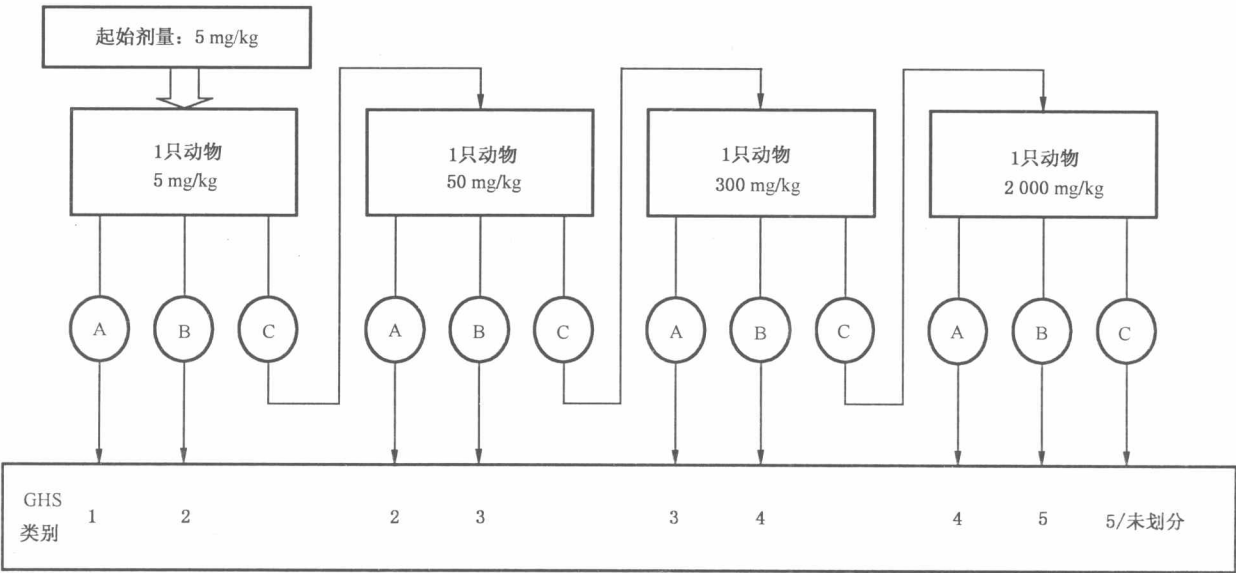


图 B.1 正式试验流程(起始剂量:5 mg/kg)

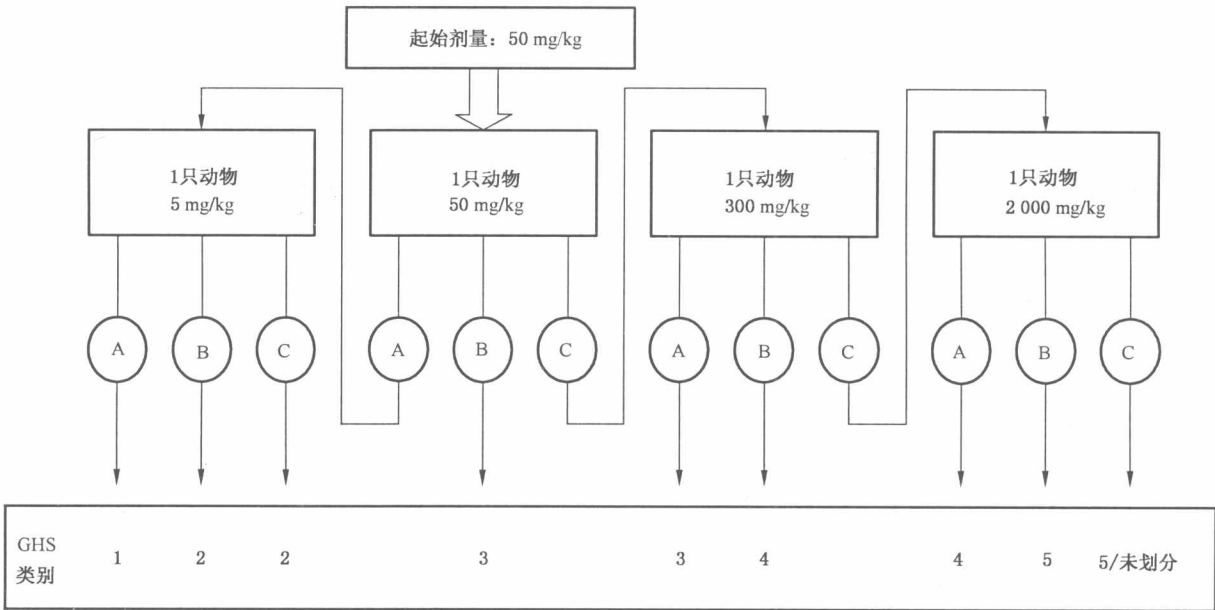


图 B.2 正式试验流程(起始剂量:50 mg/kg)

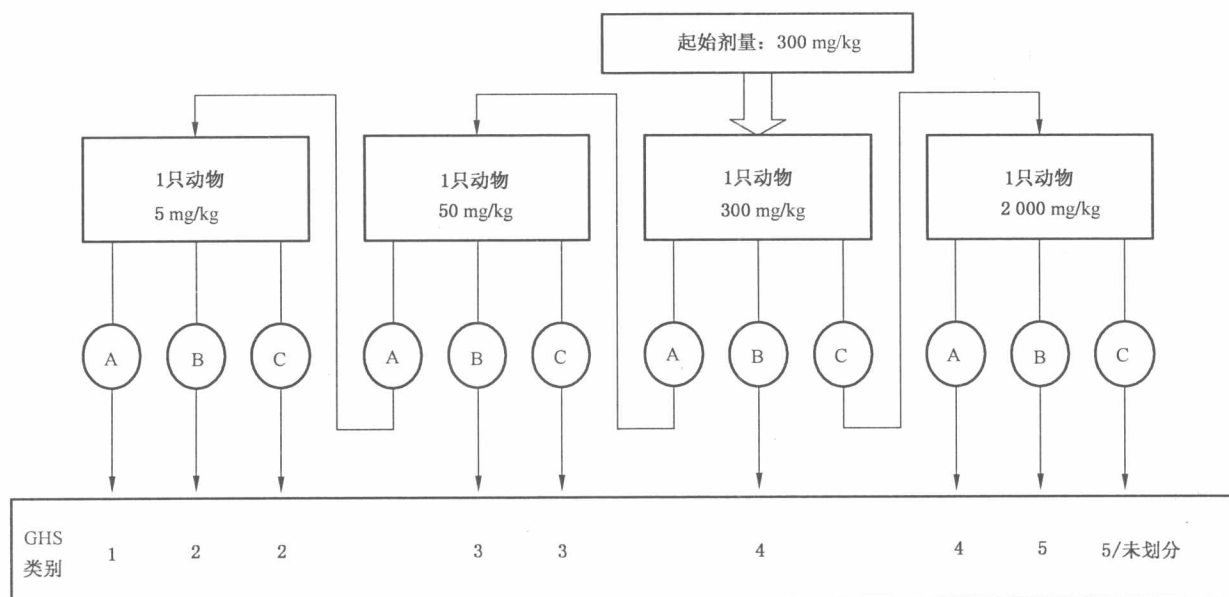


图 B.3 正式试验流程(起始剂量:300 mg/kg)

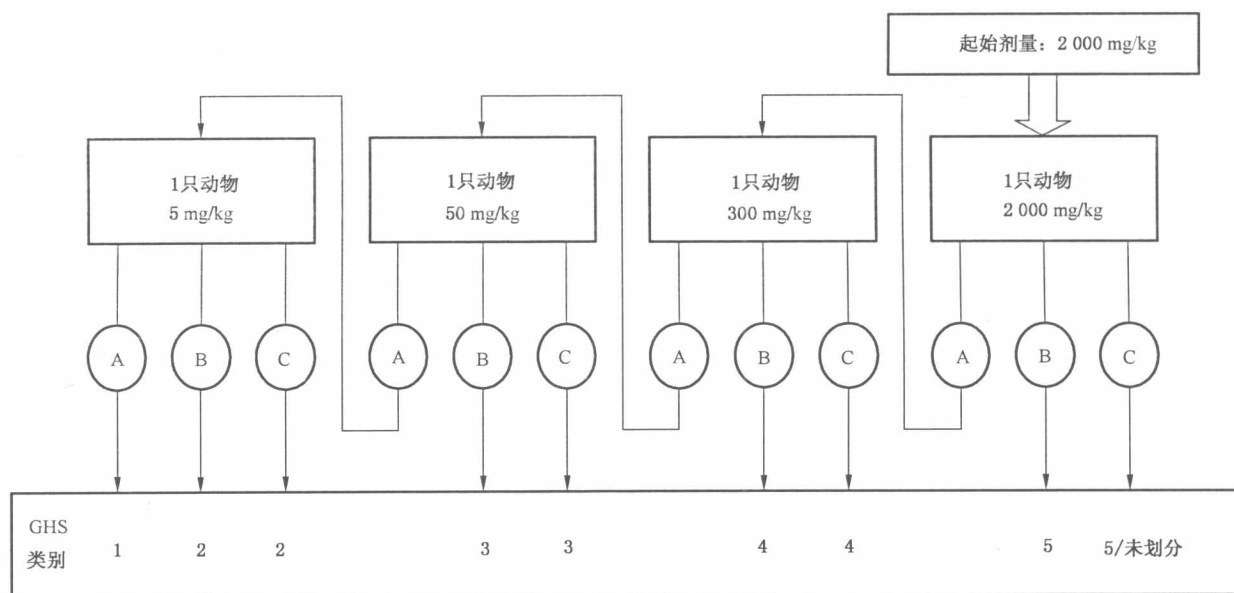


图 B.4 正式试验流程(起始剂量:2 000 mg/kg)

注: A——死亡数大于或等于2只;B——观察到明显毒性大于或等于1只,或者1只死亡;C——无毒性。正式试验中5只动物应包含预试验中该剂量组使用过的一只动物。

附录 C

(规范性附录)

试验剂量在 2 000 mg/kg 的分类说明

C.1 对于 LD_{50} 大于 2 000 mg/kg 无需试验的受试物的分类标准

C.1.1 GHS 分类急性毒性危险类别为 5 的物质具有相对较低的急性毒性,在某些特定的情况下可能对某些比较脆弱的人群带来危险。这类物质经口或经皮 LD_{50} 值预计在 2 000 mg/kg~5 000 mg/kg。或其他染毒途径获得的类似结果。

C.1.2 在下列情况下,受试物可以划为 $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (GHS 具有急性毒性,危险类别为 5):

C.1.2.1 通过附录 B 的试验步骤,根据致死率可以直接将受试物划分到第 5 类物质。

C.1.2.2 有确定的证据表明受试物的 LD_{50} 在 $2\,000\text{ mg/kg} < LD_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ 范围内,或者其他动物试验以及人类毒性反应表明该物质对人类健康具有急性毒性。

C.1.2.3 具有下列任意一种情况,且通过对数据的外推、预测或衡量不能将该物质划分到更为严重的毒性物质:

- 在急性毒性类别 4 的经口毒性试验中具有致死性;
- 在按照急性毒性类别 4 试验时专家判断出现了较为严重的毒性反应,除了腹泻,竖毛或不太明显的症状;
- 通过专家对其他动物试验的判断认为有足够的证据表明该物质有比较明显的潜在急性毒性;
- 有其他动物试验以及人类毒性反应表明该物质对人类具有毒性效应。

C.2 试验剂量大于 2 000 mg/kg

只有在特殊情况下才使用 5 000 mg/kg 的剂量。如果无明确的资料可以证明做 5 000 mg/kg 的试验对人类、动物健康和环境保护有重大意义,出于动物福利的考虑,不做 5 000 mg/kg。

C.3 预试验

附录 A 中的试验准则适用于 5 000 mg/kg。如果预试验开始于 5 000 mg/kg,结果为 A,应用第二只动物在 2 000 mg/kg 剂量开始试验;如果出现了结果 B 或 C(明显毒性或无毒性)则选取 5 000 mg/kg 作为正式试验的起始剂量。对于在 2 000 mg/kg 剂量的试验结果出现 B 或 C,应将试验推进到 5 000 mg/kg,如果 5 000 mg/kg 的试验结果为 A,则正式试验的起始剂量为 2 000 mg/kg,如果结果为 B 或 C,则正式试验的起始剂量为 5 000 mg/kg。

C.4 正式试验

附录 B 的试验准则适用于 5 000 mg/kg。如果正式试验开始于 5 000 mg/kg,结果 A(大于或等于 2 只死亡)需要选第二组动物在 2 000 mg/kg 上进行试验;如果出现结果 B(明显毒性和/或小于或等于 1 只死亡)或 C(无毒性)表明该受试物不能按照 GHS 的标准进行划分类别。在 2 000 mg/kg 剂量上的试验出现结果 B 或 C,应将试验推进到 5 000 mg/kg,如果 5 000 mg/kg 的试验结果为 A,则该物质被划分到 GHS 急性毒性,类别为 5,如果结果为 B 或 C,则该受试物不能按照 GHS 的标准进行划分类别。