

中华人民共和国国家标准

GB/T 21757—2008

化学品 急性经口毒性试验 急性毒性分类法

Chemicals—Test method of acute oral toxicity for chemicals—Acute
toxic class method

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

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. 423《化学品 急性经口毒性试验 急性毒性分类法》(2001年)(英文版)。

本标准作了下列编辑性修改：

——增加了前言部分；

——增加了 OECD 引言部分,把 OECD 原文中初始试验须知的内容纳入 OECD 引言部分；

——删除了 OECD 的参考文献部分。

本标准附录 A 和附录 B 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:广东出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位:上海出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:许崇辉、程树军、焦红、潘芳、温巧玲、陈谷峰、邱璐、刘俊平、黎庆翔。

OECD 引言

1. OECD 化学测试指南定期地根据学科发展或实际评估的需要而作出相应的修改。最初的 423 方法文本批准于 1996 年 3 月,是作为急性毒性测试的第二种常规方法,而描述于当时的 401 方法文本。由于在 1)可用粗略的 LD_{50} 值对化学物质进行分类;和 2)用单一性别(通常雌性)来测试是足够的,这两方面达成共识,因此几次专家会议都建议对原文本进行修改。

2. 急性毒性分类法,每一个步骤使用 3 只单性别动物的测试方法,根据动物的死亡率和/或濒死状态,经过 2~4 个步骤就能评定物质的急性毒性,该方法具有可重复性,使用很少的动物就得到其他急性毒性方法(测试法 420 和 425)的分类法。急性毒性分类法对使用固定剂量和较大的剂量间距和生物学评价,达到物质的毒性分类和危害评估的目的。1996 年采用的文本由于有国外体内外实验文献而获得广泛支持。

3. 根据实验目的,可以在经口毒性测试指南中找到最适当的检测方法,而且在该指南文本中,还可以找到有关 423 方法的其他信息。

4. 本方法文本的术语见于附录。

5. 在一定剂量下有腐蚀性或严重原发损伤作用,能引起动物强烈痛苦或损伤的受试物不宜经口给予。濒死动物或有严重持续痛苦症状的动物应人道处死,并在实验死亡结果中加以注释。对于如何决定濒死动物和如何预测动物即将死去,可参阅指南文件中的相关内容。

6. 本方法可依据本受试物在化学品分类及标记全球协调制度(GHS)急性毒性的分类,对受试物进行剂量和结果的预测。

7. 原则上,本方法并不能计算出精确的 LD_{50} ,但可以象其他以死亡作为终点的试验一样,给出一个致死的剂量范围。本方法在至少有二组剂量死亡率大于 0%或小于 100%时,可以算出 LD_{50} 值,受试验的剂量设计,决定着实验结果中不同中毒反应的动物数,也决定实验室和试验报告的准确性和重复性。

8. 相对试验操作,试验之前应尽可能收集研究受试物的相关资料。这些资料包括物质特性、化学结构、理化性质、受试物体内毒性检验的结果及与结构相似物质的毒理学资料及受试物的用途,这些资料有利于实验人类的防护和选择合适的起始剂量。

化学品 急性经口毒性试验 急性毒性分类法

1 范围

本标准规定了急性经口毒性试验 急性毒性分类法试验的试验目的、术语和定义、试验基本原则、试验方法、试验数据和报告。

本标准适用于检测化学品急性经口毒性分类试验。

2 试验目的

用较少的动物(不超过 12 只),逐步试验,以确定受试物的急性经口毒性及其分类。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

急性经口毒性 acute oral toxicity

受试物一次或 24 h 内多次经口给予受试动物某一剂量所引起的有害效应。

3.2

延迟死亡 delayed death

动物死亡或濒死不是发生在染毒后 48 h 内,而是死于随后的 14 d 观察期内。

3.3

剂量 dose

所给受试物的量,常以质量(g,mg)或以受试动物单位体重的受试物的质量(mg/kg)来表示。

3.4

行将死亡 impending death

预计在下一个观察期之前将出现濒死或死亡。在啮齿动物这一状态的表现指征包括惊厥、侧卧、躺卧不动、寒颤等。

3.5

经口半数致死剂量 median lethal oral dose; LD₅₀

一次性经口给予受试物预期会引起 50%动物死亡的统计学剂量,LD₅₀值以动物单位体重接受受试物的质量(mg/kg)来表示。

3.6

限量 limit dose

试验的上限剂量(2 000 mg/kg 或 5 000 mg/kg)。

3.7

濒死状态 moribund status

实验动物正在死亡或即使救治也不能存活状态。

3.8

预期死亡 predictable death

临床指征显示在实验期内的某一时间将出现死亡,如不能进食和饮水。

4 试验基本原则

本方法的原则是每一步骤使用最小的实验动物数量,逐步进行试验,以获得受试物分类所需的足够急性毒性的结果资料。受试物经口给予所设剂量的一组实验动物,逐步进行,每一步骤使用3只单性别(常为雌性)动物。一个步骤的死亡率决定下一步骤的试验,即

- 无需进一步实验;
- 同一剂量水平再做3只动物;
- 在高一级或低一级的剂量水平另做3只动物。

5 试验方法

5.1 实验动物

5.1.1 动物种属选择

首选的啮齿动物为大鼠,但也可使用其他啮齿动物,通常用雌性动物。这是因为对常规LD₅₀试验的文献调查显示,虽然动物不同性别间的敏感性存在一定的差异,但所见的差异表明雌性动物稍微敏感。假如已知结构类似物质的毒理学或毒物代谢动力学已显示雄性动物可能更敏感,那么就应选用雄性动物。故在用雄性动物实验时,应提供充足的理由。

5.1.2 通常实验使用的动物品系应是初成年健康的动物。雌性动物应是未产、未孕育的动物。开始给动物受试物的年龄应为8至12周龄,其体重应在同组动物平均体重的±20%内。

5.1.3 实验动物饲养条件

实验动物房的温度应为22℃±3℃,相对湿度至少30%,而不超过70%,最好为50%~60%。应采用人工照明,每12h光暗交替。用常规实验室饲料喂养,饮水不限。动物可按剂量组笼养,但每笼的动物数不应影响对每一实验动物清晰地观察。

5.1.4 实验动物的准备

随机选择实验动物,逐个标上识别标记,在给受试物前,至少笼养5d以适应实验室条件。

5.2 剂量准备

一般而言,整个试验的各剂量组给予动物的受试物应是一个恒定的体积,其方法可通过改变受试物的浓度来达到所要求的体积。但是,在检验液体或混合液体受试物时,使用浓度恒定的不稀释受试物,可能更有利于随后对该受试物的危险度评价,但这样做需要有关负责人同意。另一方面,给予实验动物的量不能过大。液体样本的一次最大给予量决定于受试动物的大小。对于啮齿动物,通常一次给予的体积不能超过1 mL/100 g,但如果是水溶样本,也可给予2 mL/100 g。关于剂型,建议尽可能使水溶液/水悬浮液/水乳液,其次为用玉米油配制的溶液/悬浮液/乳液,再次为其他赋形剂配制的溶液。除水外,应知道赋形剂的毒理学性质。除非确定溶液样本在整个实验期间有足够的稳定性,一般样本都在染毒前不久配制。

5.3 试验过程

5.3.1 染毒

受试物通过胃管或合适插管用管饲法一次给予。有时不可能一次给足剂量,则可在24 h内分数次给予来达到所需剂量。

灌胃前,实验动物应先禁食(如大鼠,禁食而不禁饮水过夜;如小鼠,禁食不禁水3 h~4 h)。禁食期过后,称动物体重,给予受试物。染毒完成后,大鼠仍应禁食3 h~4 h,小鼠应禁食1 h~2 h。如剂量是24 h内多次染毒的,则可根据间隔时间长短,适当给予动物饲料和饮水。

5.3.2 动物数量和剂量水平

每一步骤使用3只动物,所用的初始剂量可以从4个固定剂量5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg和2 000 mg/kg中选取。初始剂量最好能引起受试动物有一定的死亡率。附录1的流程图描述了每一初

始剂量应遵循的实验操作程序。

当现有的资料提示,最高的初始剂量(2 000 mg/kg)不可能引起实验动物死亡,则应做限量试验。假如无受试物的相关资料,出于对动物福利考虑,建议初始剂量从 300 mg/kg 开始。

各剂量组实验的间隔期长短,取决于毒作用快慢,持续时间和严重程度。当确信前一步骤的受试物能存活时,才进行下一步实验。

特殊情况下或确实因为需要,才考虑另一上限为 5 000 mg/kg 剂量水平的实验(见附录 B)。出于对动物福利的考虑,在 GHS 分类中属 5 类的化学品(2 000 mg/kg~5 000 mg/kg),只有充分相信这一试验结果直接与保护人类、动物或环境有关时,才进行这一剂量的动物实验。

5.3.3 限量实验

限量实验主要用于当实验者有资料显示受试物可能无毒性的情况下,即受试物只有大于常规限定剂量才有毒性时。有关受试物质的毒性资料,可来源于以前检测相类似的受试化合物、混合物或产品,并考虑有毒理学意义的组分的性质和含的百分比。在某些情况下,可能受试物的毒性资料很少或没有,或者预期受试物有一定的毒性,则不应做限量试验。

完成 2 000 mg/kg 的限量实验,需要用 6 只动物(每步骤 3 只)。有时 5 000 mg/kg 剂量的限量实验,可以只用 3 只动物进行(见附录 B),但假如受试物引起动物死亡,则应进一步做下面一个较低剂量水平的检验。

5.4 观察

5.4.1 在染毒后的 30 min 内至少对每一动物观察一次和第一个 24 h 内要定期逐一观察,特别要观察头 4 h 的情况。随后每天定期观察,直至第 14 天。当然,观察期并不严格固定的,它取决于毒性反应,发作时间和恢复期长短。必要时还可延长观察期。毒性症状出现和消失的时间很重要,尤其是存在迟发性症状时。所有的观察应系统地逐个记录和保存,如动物继续出现毒性症状还需要进行观察。

观察应包括皮肤、毛发、眼、粘膜和呼吸系统、循环系统、自主和中枢神经系统、身态和行为的改变。应注意观察有无震颤、惊厥、流涎、腹泻、嗜睡、睡眠和昏迷等。发现濒死动物和重病动物应予以人道地处死。当动物被人道处死或发现死亡时,应尽可能准确记录死亡时间。

5.4.2 体重

在给予受试物前一刻,应称量每只动物的体重,在随后实验中,至少每周一次称量体重。要计算和记录动物体重的变化,在实验结束时,要记录存活动物的体重并作人道处死。

5.4.3 病理学检查

所有受试动物(包括那些实验期间死亡或以动物福利为由人道处死的动物)都应作大体解剖。每一动物的所有大体病理学改变都应作记录。存活 24 h 或更长时间动物,若发现器官有大体病理学改变,应考虑作组织病理学检查,它或许能提供有用的信息。

6 试验数据和试验报告

6.1 试验数据

应提供每一实验动物的资料。并且所有资料应以表格形式列出,以显示每一剂量组所用的动物数,出现毒性症状的动物数,实验期间死亡和以人道理由处死的动物数,各动物的死亡时间,毒作用的描述及其出现和消失的时间,以及毒作用的可逆性和死检所见。

6.2 试验报告:试验报告应包括以下资料:

6.2.1 受试物

- 物理性状、纯度及其相关的理化性质(包括其异构体);
- 识别资料,CAS 码。

6.2.2 溶剂

- 溶剂选择依据(不包括水)。

6.2.3 实验动物

- 所用的种属/品系；
- 实验动物所带的微生物情况(知道时)；
- 动物的数量、年龄、性别(包括为何用雄性替代雌性)；
- 来源,动物房的环境条件、饲料等。

6.2.4 试验条件

- 受试物组份的详细资料,包括受试物物质形态的详细资料；
- 受试物给予的详细资料,包括给予体积和时间；
- 水和饲料质量的详细资料(包括饲料的类型/来源和水来源)；
- 初始剂量选择理由。

6.2.5 实验结果

- 每一实验动物的资料和剂量水平以表格列出(即包括死亡在内的动物毒性症状,毒效应的性质、严重性和持续时间)；
- 体重和体重改变的表格；
- 染毒每天若动物在规定处死的日期之前死亡,则应记录死亡日期和时间,各动物染的体重,随后每周的体重和死亡时或实验结束处死时的体重的记录表格；
- 每一动物症状出现的时间进程,以及症状是否可逆；
- 每一动物尸检和组织病理学所见。

6.3 实验结果的讨论和解释

6.4 结论

附 录 A
(规范性附录)

各初始剂量应遵循的操作程序

A.1 下列图中的各试验流程图的初始剂量,按实验操作程序概要如下:

图 A.1:5 mg/kg 初始剂量;

图 A.2:50 mg/kg 初始剂量;

图 A.3:300 mg/kg 初始剂量;

图 A.4:2 000 mg/kg 初始剂量。

A.2 依据死亡或人道处死的动物数,用箭头表示实验操作程序。

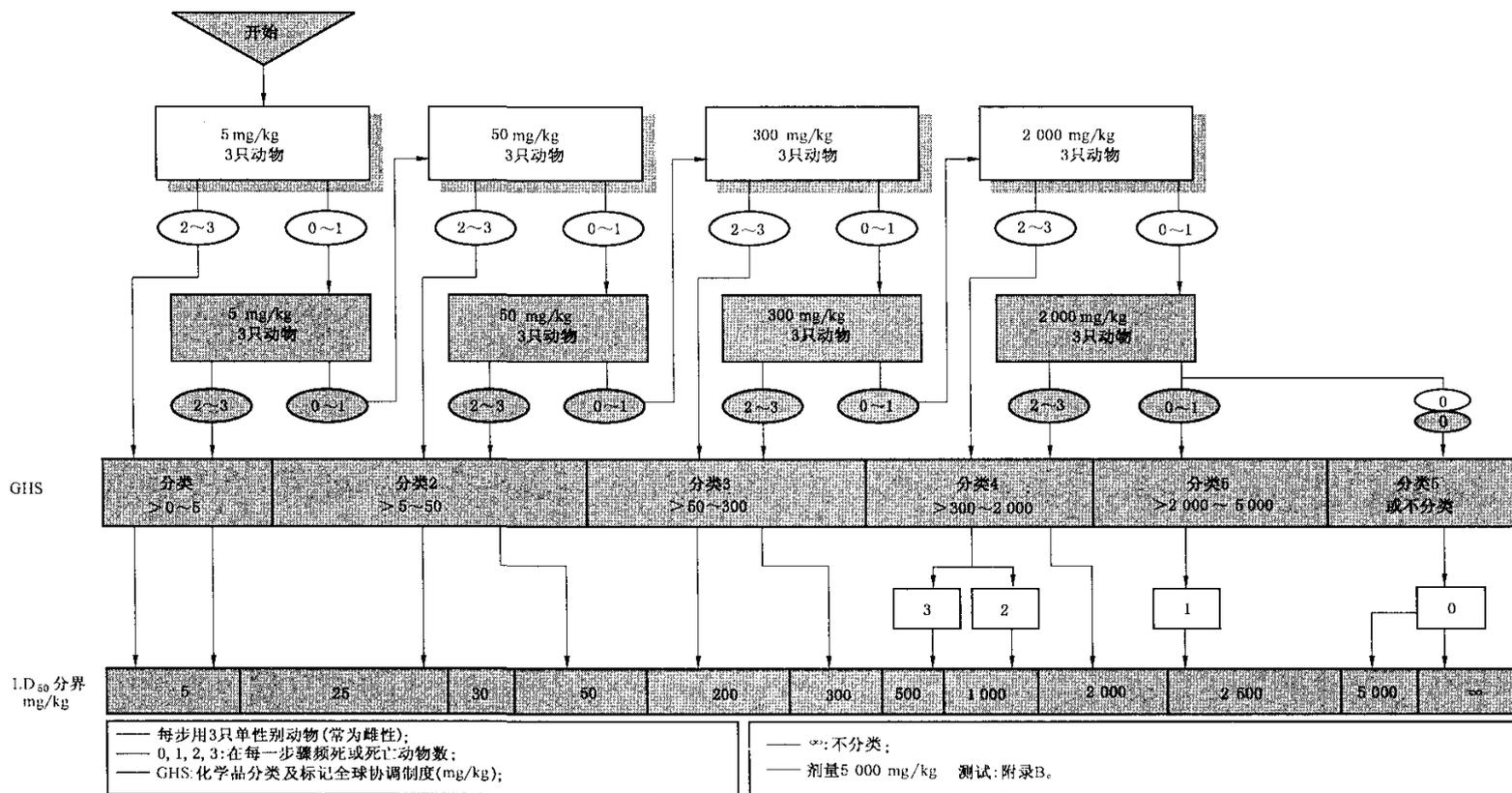


图 A.1 初始剂量 5 mg/kg 的试验程序

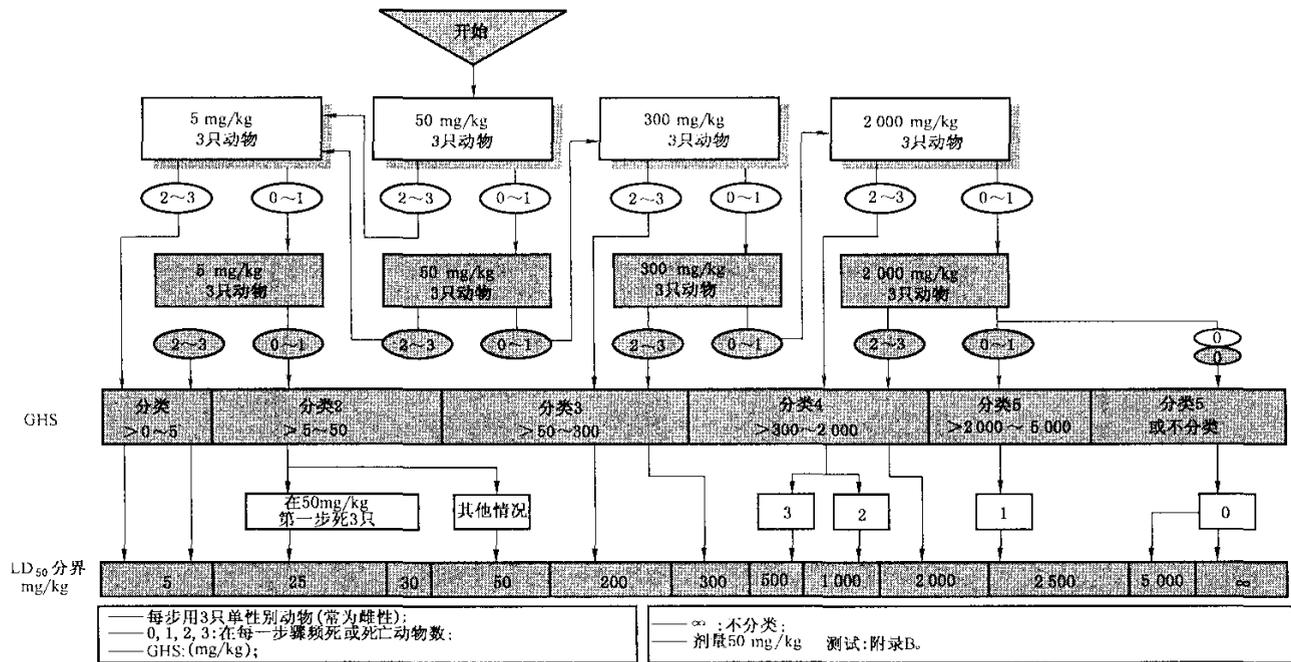


图 A.2 初始剂量 50 mg/kg 的试验程序

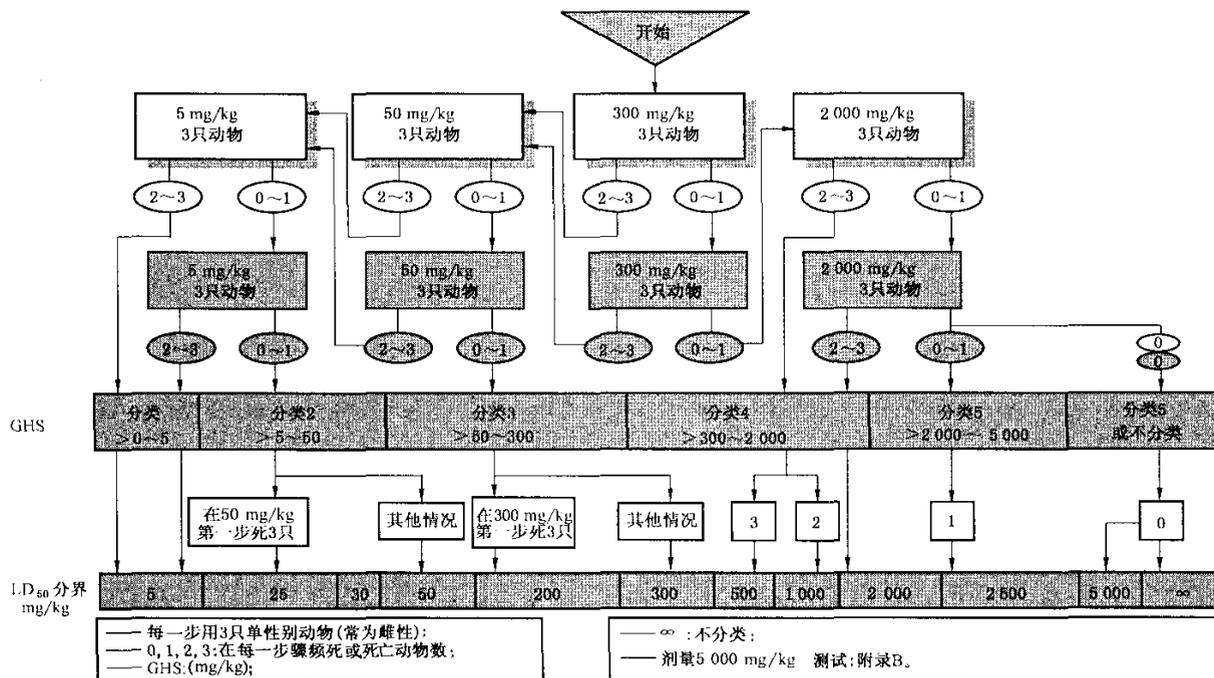


图 A.3 初始剂量 300 mg/kg 的试验程序

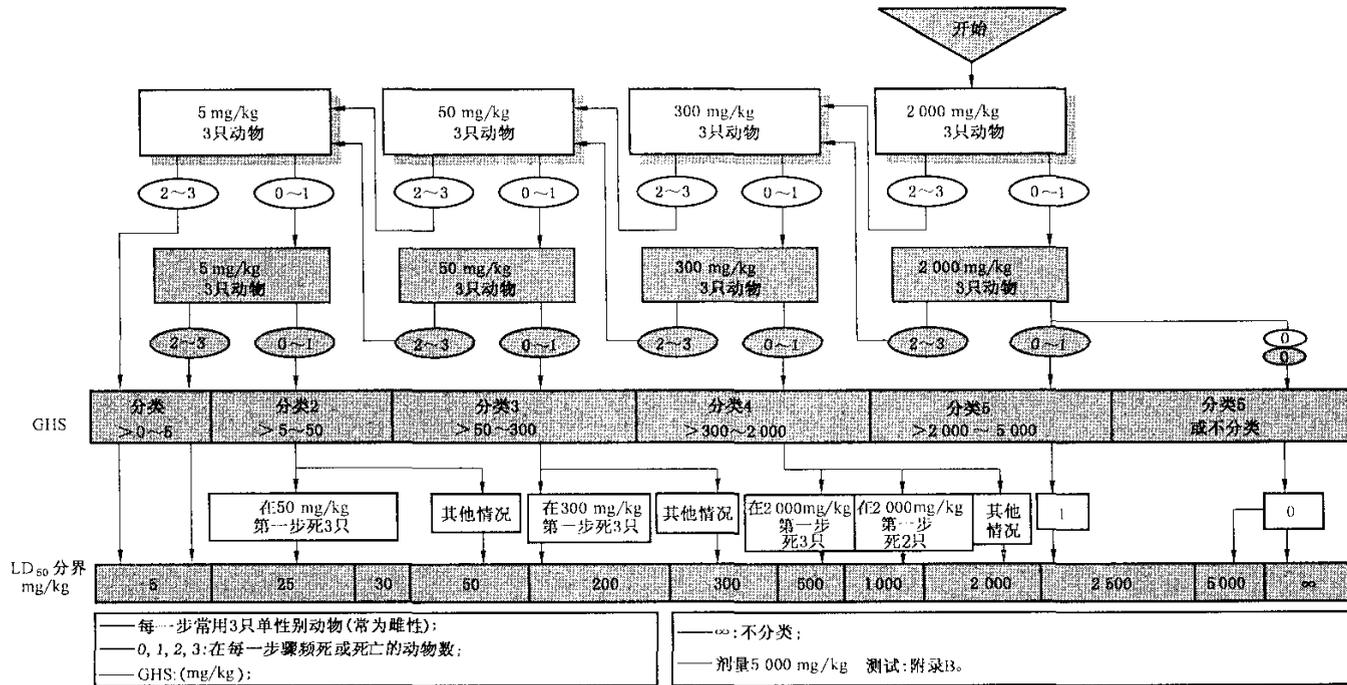


图 A.4 初始剂量 2 000 mg/kg 的试验程序

附录 B
(规范性附录)

预计受试物 LD₅₀ 值超过 2 000 mg/kg 的方法

B.1 危害 5 类标准是用于检测急性毒性相对较低,但在某些情况下对易感人群有危险的受试物的方法。这类受试物预计经口、经皮或经其他途径的 LD₅₀ 值在 2 000 mg/kg~5 000 mg/kg 之间,在下列情况下,其风险分类界定于: $2\,000\text{ mg/kg} < \text{LD}_{50} < 5\,000\text{ mg/kg}$ (在 GHS 属分类 5):

- a) 在附录 A 图 A.1~图 A.4 的检测中无死亡发生。
- b) 已有 LD₅₀ 在 5 类范围内,或其他动物研究和人体急性毒性的可靠资料。
- c) 通过外推法,可预测受试物不属于风险更大的分类,和
 - 已有人体毒作用的可靠资料,或
 - 在分类 4 中检测到经口死亡,或
 - 检测到分类 4 步骤,专家又判定除了腹泻等外无明显的中毒症状;
 - 根据其他动物急性毒性研究的资料所作出的专家判定;
 - 剂量大于 2 000 mg/kg 的检测。

B.2 出于对动物福利保护需要,分类 5 (5 000 mg/kg) 的试验只有在确实有保护人类健康和动物健康的需要时才进行,高于该剂量水平的测试就不应进行。

B.3 当进行 5 000 mg/kg 剂量测试时,只需要一个步骤(即 3 只动物)。如第 1 只动物死亡,则按附录 A 进行 2 000 mg/kg 的试验程序。如第 1 只动物存活,则做后 2 个动物。假如 3 只动物只死亡 1 只,则 LD₅₀ 大于 5 000 mg/kg。如 2 只动物都死亡,则做 2 000 mg/kg 剂量水平的实验。
