



中华人民共和国国家标准

GB/T 22487—2008

水产饲料安全性评价 急性毒性试验规程

Principle of aquafeed safety evaluation—Acute toxicity test

2008-11-04 发布

2009-02-01 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

本标准是在参阅了 GB/T 13267—1991《水质 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法》和 GB 15193.3—2003《急性毒性试验》及国内外相关文献的基础上,根据我国技术发展水平研究制定的。

本标准的附录 A 和附录 B 为规范性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院饲料研究所、国家水产饲料安全评价基地。

本标准主要起草人:薛敏、刘海燕、吴秀峰。

水产饲料安全性评价 急性毒性试验规程

1 范围

本标准规定了水产饲料安全性评价急性毒性试验规程的基本技术要求。

本标准适用于水产饲料原料及水产饲料添加剂的安全性评价,不包括饲料药物添加剂。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB 11607 渔业水质标准

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

接触致毒法 touching test

将受试物按照一定浓度梯度溶解稀释于水,然后放入试验水产动物。

3.2

口服致毒法 oral test

将受试物一次或分次饲喂或灌服给试验动物。

3.3

注射致毒法 injection test

将受试物配成一定浓度的溶液,按试验动物的体重用注射器直接将一定量的受试物溶液作腹腔或肌肉注射。

3.4

半数致死浓度 median lethal concentration; LC_{50}

接触致毒后,引起动物死亡率为50%的水体中受试物的浓度,该浓度为经过统计得出的估计值。其单位是每升水体中受试物的量,以毫克每升(mg/L)或克每升(g/L)表示。

3.5

半数致死剂量 median lethal dose; LD_{50}

经口或注射给予受试物后,预期在一定时间内能够引起动物死亡率为50%的受试物剂量。该剂量为经过统计得出的估计值。其单位是每千克体重所摄入或注射进入的受试物的量,以毫克每千克体重(mg/kg 体重)、克每千克体重(g/kg 体重)或毫升每千克体重(mL/kg 体重)表示。

3.6

最大耐受剂量(MTD)法 test of maximum tolerated concentration (dose)

用最大使用浓度和最大口服或注射容量给予至少10尾试验水产动物后,连续观察7 d~14 d,未见

任何动物死亡,则 MTD 大于该浓度(mg/L,g/kg 体重)。

3.7

静水式试验 static water test

采用接触致毒法时,试验水产动物所在容器内的试验溶液处于静止状态,试验期间不更换试验溶液。静水式试验只适用于在试验期间稳定而又耗氧不高的受试物。

3.8

换水式试验 semi-static water test

采用接触致毒法时,每 24 h 或更短的时间内更换一次同种试验浓度试验液,更换时间根据受试物的稳定性确定,保证波动范围在初始值的 20%之内。可用于受试物浓度在更换试验液的时间内相对稳定的试验。

3.9

流水式试验 flow-through test

采用接触致毒法时,试验液连续更新,可用于大多数物质,包括水中不稳定的物质。

3.10

循环水养殖系统 recirculation system

养殖用水在系统内经过净化处理后循环使用的养殖系统。

3.11

流水养殖系统 flow-through system

来自系统外的养殖用水连续或间歇地流经养殖容器的养殖系统。

4 原理

通过接触、口服或注射对试验动物致毒后,在短时间内观察动物所产生的毒性反应,包括致死的和非致死的指标参数,通常用半数致死浓度(LC₅₀)或半数致死剂量(LD₅₀)来表示。

5 试验动物

5.1 试验动物的选择

5.1.1 选择对受试物敏感的试验水产动物

选取不同分类地位、不同食性及不同养殖环境下的 3 种以上水产动物各 10 尾进行急性毒性试验预试验,筛选其中对受试物敏感的 1 种水产动物作为试验动物。对于预试验中求不出 LC₅₀和 LD₅₀的受试物,可以选择其中任何 1 种水产动物作为试验动物。

5.1.2 试验水产动物选用种质纯正、规格整齐、体格健康的同批苗种。正式试验前应有 7 d~15 d 的驯养期。

5.2 试验水产动物的饲养管理

试验开始前 24 h 停止投喂,用于接触致毒试验的水产动物在试验期间停止投喂,用于口服及注射试验水产动物正常投喂。

6 操作步骤

6.1 接触致毒试验

6.1.1 制备受试物储备液

配制受试物储备液所用试剂至少为分析纯或给定已知浓度产品,所用水应符合 GB/T 6682 中三级水的规定。将已知量的受试物溶于一定体积的水中。储备液应当天配制。对于化学性质较稳定的物质,可配制供 2 d 以上使用的溶液,配好后 0℃~4℃保存。对于那些难溶于水的物质,可采用适当的方法使其溶解或乳化,如使用超声波、有机溶剂、乳化剂等。有机溶剂在试验溶液中的浓度不应超过

0.1 mg/L。

6.1.2 试验溶液的配制

向水中加入适当的受试物储备液,使达到所需要的浓度。

6.1.3 试验水产动物分组操作

迅速将试验水产动物转移到配制好的不同受试物浓度的养殖容器中,前后不应超过 30 min。

6.2 口服及注射致毒试验

6.2.1 受试物的处理

受试物应溶解或悬浮于适宜的介质中。一般采用水或食用植物油作介质,可以考虑用羧甲基纤维素、明胶、淀粉等配成混悬液;不能配制成混悬液时,可配制成其他形式(如糊状物等)。

6.2.2 受试物的给予

各剂量组的口服或注射容量要相同(mL/kg 体重)。常用注射容量为 10 mL/kg 体重。一般一次性给予受试物,也可一日内多次给予(每次间隔 4 h~6 h,24 h 内不超过 3 次,合并作为一次剂量计算)。将受试物用于口服的方式可采用自主摄食或人工灌服;而注射的方式可采用腹腔或肌肉注射;将试验水产动物离水进行灌服或注射操作时一定要使用麻醉剂(见附录 A)。

7 试验条件

7.1 试验系统

在接触致毒试验中可采用静水式试验、换水式试验或流水式试验,同时保持受试物在水中浓度的稳定性,并要保证水质指标符合 GB 11607 的规定,必要时可以采取气泵增氧措施。

口服或注射致毒试验中可根据试验情况采用静水养殖系统或流水养殖系统。

7.2 试验容器

根据受试物性质,针对性地选择无毒、对受试物吸附性能低材料制成的容器。受试物为重金属离子时使用由聚乙烯制成的容器;受试物为有机化合物时使用玻璃、玻璃钢容器或搪瓷容器。

7.3 试验水温

进行急性毒性试验期间,养殖系统水体温度要保持在试验水产动物生长的适宜温度范围内并相对恒定,水温温差小于 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

7.4 试验周期

7.4.1 接触致毒试验期为 24 h、48 h 或 96 h,可以观察得出 24 h、48 h 及 96 h 的 LC_{50} 。

7.4.2 口服或注射致毒试验期为 7 d~14 d,根据试验水产动物的死亡情况,得出 LD_{50} 。

8 几种常用的急性毒性试验设计方法

8.1 寇氏(Korbor)法

8.1.1 预试验

除另有要求外,应在预试验中求得动物全死亡或 90%以上死亡的剂量和动物不死亡或 10%以下死亡的剂量,分别作为正式试验的最高与最低剂量。

8.1.2 动物数

除另有要求外,设 5 个~10 个剂量组,每组不少于 6 个重复,每个重复至少 30 个个体。

8.1.3 剂量

将由预试验得出的最高、最低剂量换算为常用对数,然后将最高、最低剂量的对数差按所需要的组数,分为几个对数等距(或不等距)的剂量组,应设计空白对照组。

8.1.4 试验结果的计算与统计

8.1.4.1 列试验数据及其计算表

包括各组剂量(mg/kg 体重, g/kg 体重),剂量对数(X),动物数(n),动物死亡数(r),动物死亡百分

比(P ,以小数表示),相邻剂量比值的对数(d),以及统计公式中要求的其他计算数据项目。

8.1.4.2 LD_{50} 的计算公式

根据试验条件及试验结果,可分别选用下列三个公式中的一个,求出 $\lg LD_{50}$,再查反对数表,求得 LD_{50} (mg/kg 体重, g/kg 体重)。

8.1.4.2.1 按本试验设计得出的任何结果,均可用式(1)计算出 $\lg LD_{50}$ 。

$$\lg LD_{50} = \sum \frac{1}{2}(X_i + X_{i+1}) \cdot (P_{i+1} - P_i) \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i, X_{i+1} ——相邻两组的剂量对数。

P_{i+1}, P_i ——相邻两组的动物死亡百分比。

8.1.4.2.2 按本试验设计且各组间剂量对数等距时,可用式(2)计算出 $\lg LD_{50}$ 。

$$\lg LD_{50} = XK - \frac{d}{2}(P_{i+1} - P_i) \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

XK ——最高剂量对数,其他同式(1)。

8.1.4.2.3 当试验条件同 8.1.4.2.2 且最高、最低剂量组动物死亡百分比(以小数表示)分别为 1(全死)和 0(全不死时),则可用便于计算的式(3)。

$$\lg LD_{50} = XK - d(\sum P - 0.5) \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$\sum P$ ——各组动物死亡百分比之和,其他同式(2)。

8.1.4.3 标准误差与 95%可信限

8.1.4.3.1 $\lg LD_{50}$ 的标准误差(S)计算见式(4)。

$$S_{\lg LD_{50}} = d \sqrt{\frac{\sum P_i(1 - P_i)}{n}} \quad \dots\dots\dots(4)$$

8.1.4.3.2 95%可信限(X)的计算见式(5)。

$$X = \lg^{-1}(\lg LD_{50} \pm 1.96 S_{\lg LD_{50}}) \quad \dots\dots\dots(5)$$

此法易于理解,计算简便,可信限不大,结果可靠,特别是在试验前对受试物的急性毒性程度了解不多时,尤为适用。

8.2 机率单位-对数图解法

8.2.1 预试验

以每组 3 个个体至 5 个个体找出全死和全不死的剂量。

8.2.2 动物数

除另有要求外,每组不少于 6 个重复,每个重复至少 30 个个体。

8.2.3 剂量及分组

在预试验中得到的两个剂量组之间拟出等比的六个剂量组或更多的组。此法不要求剂量组间呈等比关系,但等比可使各点距离相等,有利于作图,应设计空白对照组。

8.2.4 作图计算

8.2.4.1 将各组按剂量及死亡百分率,在对数概率纸上或计算机作图。除死亡百分率为 0 及 100% 者外,也可将剂量化成对数,并将百分率查概率单位表得其相应的概率单位作点于普通算术格纸上,0 及 100% 死亡率在理论上不存在,为计算需要:

$$0 \text{ 改为 } \frac{0.25 \times 100}{N} \%, 100\% \text{ 改为 } \frac{(N-0.25)}{N} \times 100\%.$$

其中: N 为该组动物数,相当于 0 及 100% 的作图用概率单位。

8.2.4.2 划出直线,以透明尺目测,并照顾概率。

8.2.5 计算标准误差

标准误差的计算见式(6)。

$$SE = 2S / \sqrt{2N'} \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

SE——标准误差;

2S——LD₈₄与LD₁₆之差,即 $2S = LD_{84} - LD_{16}$ (或 $ED_{84} - ED_{16}$);

N'——概率单位3.5~6.5之间(反应百分率为6.7~93.7之间)各组动物数之和。

相当于LD₈₄及LD₁₆的剂量均可从所作直线上找到。也可用普通方格纸或计算机作图,查表将剂量换算成对数值,将死亡率换算成概率单位,方格纸横坐标为剂量对数,纵坐标为概率单位,根据剂量对数及概率单位作点连成线,由概率单位5处作一水平线与直线相交,由相交点向横坐标作一垂直线,在横坐标上的相交点即为剂量对数值,求反对数致死量(LD₅₀)值。

8.3 最大耐受剂量法

8.3.1 适宜条件:毒性极小的或未显示毒性的受试物,给予动物最大使用浓度和最大口服及注射容量时,仍不出现死亡。

8.3.2 动物数:除另有要求外,每组不少于6个重复,每个重复至少30个个体。

8.3.3 剂量:受试物最大使用浓度和口服及注射体积(一个剂量组)。

8.3.4 方法:试验水产动物在试验前需在相同试验条件下驯养、观察7 d,试验前一天停止喂食,试验时给予最大使用浓度或最大口服及注射容量的受试物(1 d内1次或多次给予,1 d内最多不超过3次),连续观察7 d~14 d,动物不出现死亡,则认为受试物对某种动物的急性毒性最大耐受剂量大于某一数值(mg/L或g/kg体重)。最大口服及注射容量为20 mL/kg体重。

9 中毒反应观察

给予受试物后,即观察并记录试验水产动物的中毒表现(如丧失平衡)和死亡情况。包括出现的程度与时间。对死亡动物进行解剖。

10 结果评价

根据LC₅₀或LD₅₀数值,判定受试物的毒性分级。由中毒表现初步提示毒作用特征。急性毒性(LD₅₀)剂量分级表见附录B。

附 录 A
(规范性附录)

急性毒性(LD₅₀)实验中常用麻醉剂及使用剂量

表 A.1 急性毒性(LD₅₀)实验中常用麻醉剂及使用剂量表

名称和化学式	别名	性状	使用浓度	作用时间
三卡因 Tricaine Methanesulphonate $C_{10}H_{15}NO_3S$	鱼保安 MS222 Finquel™	白色微细结晶粉末， 易溶于水	25 mg/L~ 300 mg/L	1 min~3 min
丁香酚 Eugenol 2-甲氧-4 丙烯基酚	AQUI-S	可直接分散于海水和淡水中， 无需缓冲液	25 mg/L~ 100 mg/L	40 s~1 min
三氯叔丁醇 Chloroentanol $C_4H_7Cl_3O \cdot 0.5H_2O$	—	白色微细结晶粉末， 易溶于有机溶剂	100 mg/L~ 1 200 mg/L	20 s~1 min

附 录 B
(规范性附录)
急性毒性剂量分级

表 B.1 急性毒性剂量分级表

级 别	水产动物接触致毒 $LC_{50}/(\text{mg/L})$	水产动物口服及注射致毒 $LD_{50}/(\text{mg/kg})$
极毒	<1	<1
剧毒	$1\sim 100$	$1\sim 50$
中等毒	$100\sim 1\ 000$	$51\sim 500$
低毒	$1\ 000\sim 10\ 000$	$501\sim 5\ 000$
实际无毒	$>10\ 000$	$5\ 001\sim 15\ 000$