



中华人民共和国国家标准

GB/T 23186—2009

水产饲料安全性评价 慢性毒性试验规程

Principle of aquafeed safety evaluation—Chronic toxicity test

2009-03-28 发布

2009-09-01 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

本标准是在参照了 GB 15193.13—2003《30天和90天喂养试验》、GB 15193.17—2003《慢性毒性和致癌试验》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 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)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:刘海燕、薛敏、吴秀峰、郑银桦。

水产饲料安全性评价 慢性毒性试验规程

1 范围

本标准规定了水产饲料安全性评价慢性毒性试验规程的基本技术要求。

本标准适用于水产动物使用的配合饲料、单一饲料及饲料添加剂的安全性评价,不包括饲料药物添加剂。

注:本标准推荐试验动物为鱼类,不排除使用其他水产动物,但应对试验条件及观察指标作相应的改变。

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 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法

GB 11607 渔业水质标准

GB 13078 饲料卫生标准

GB/T 22487 水产饲料安全性评价 急性毒性试验规程

GB/T 23388 水产饲料安全性评价 残留和蓄积试验规程

GB/T 23389 水产饲料安全性评价 繁殖试验规程

NY 5072 无公害食品 渔用配合饲料安全限量

3 术语、定义和缩略语

下列术语、定义和缩略语适用于本标准。

3.1

最大未观察到有害作用剂量 no-observed-adverse-effect-level; NOAEL

通过动物试验,以现有的技术手段和检测指标未观察到与受试物有关的毒性作用的最大剂量。

3.2

最大允许致毒作用浓度 maximum acceptable toxicity concentration; MATC

对试验动物无统计显著性有害效应的最高浓度与邻近的对试验动物有统计显著性有害效应的最低浓度之间的假定阈浓度。

3.3

靶器官 target organ

试验动物出现由受试物引起的明显毒性作用的任何器官。

3.4

慢性毒性 chronic toxicity

试验动物较长时间连续接触受试物出现的受毒害作用。

3.5

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。

3.6

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。

3.7

水产养殖周期 aquaculture period

某一批水产动物种苗在水体中养成上市所耗费的时间。

3.8

初始体重 initial body weight; IBW

试验开始时试验动物的平均重量。

3.9

终末体重 final body weight; FBW

试验结束时试验动物的平均重量。

3.10

摄食率 feeding rate; FR

试验期间,试验水产动物平均体重的日摄食量百分数,计算公式见式(1)。

$$\text{摄食率} = R_t / [(W_0 + W_t) / 2] / t \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

R_t, t, W_0 与 W_t ——分别为摄食量,试验天数,初始总体重与终末总体重。

3.11

饲料转化比(饲料系数) feed conversion ratio; FCR

试验期间,试验水产动物单位增重所消耗的饲料量,计算公式见式(2)。

$$\text{饲料转化比} = R_t / (W_t + W_d - W_0) \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

R_t, W_t, W_d 与 W_0 ——分别为摄食量,终末总体重,死亡试验动物体重与初始总体重。

3.12

增重率 weight gain; WG

试验水产动物在试验期间的增重相对于初始体重的百分率,计算公式见式(3)。

$$\text{增重率} = (FBW - IBW) / IBW \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

FBW 与 IBW——分别为终末体重与初始体重。

3.13

特定生长率 specific growth rate; SGR

试验水产动物在试验期间的日增重速率,计算公式见式(4)。

$$\text{特定生长率} = [\ln(FBW) - \ln(IBW)] / t \times 100\% \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

FBW, IBW 与 t ——分别为终末体重,初始体重与试验天数。

3.14

存活率 survival

试验期间,试验水产动物的存活数占初始数的百分率,计算公式见式(5)。

$$\text{存活率} = \text{存活尾数} / \text{初始尾数} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (5)$$

4 原理

通过饲喂受试物或饲喂添加受试物的饲料,观察试验动物在摄食后的大部分养殖周期内所产生的

各种摄食、生长及生理生化反应,阐明受试物的毒性表现,确定最大未观察到有害作用剂量(NOAE)、受试物的最大允许致毒作用浓度(MATC),作为最终评定受试物在水产饲料中应用的安全性并确定其安全限量的参考依据。

5 试验动物

试验动物应选择依据 GB/T 22487 所筛选的对受试物敏感的水产动物进行试验,试验动物选用种属和来源明确、健康、规格整齐的同批苗种。正式试验前应有 2 周的驯养期。驯养期内如果动物死亡率高于 10%,则淘汰该批苗种。驯养期结束后应淘汰由于驯养造成的质量差异的个体,保留健康活泼的水产动物继续作为试验动物。

6 剂量与分组

6.1 剂量设计参考的原则

6.1.1 原则上高剂量组的动物在饲喂受试物期间应当出现明显中毒反应,低剂量组不出现中毒反应。在高剂量组和低剂量组之间再设 2 个及 2 个以上剂量组,以期获得比较明确的剂量-反应关系。对能或不能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物分别进行规定。

6.1.2 能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物:以经口服或注射 LD_{50} 的 10%~25% 作为慢性毒性试验的最高剂量组,此 LD_{50} 百分比的选择主要参考 LD_{50} 剂量反应曲线的斜率。然后在此剂量下设几个剂量组,最低剂量组至少是试验水产动物可能摄入量的 3 倍。

6.1.3 不能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物:慢性毒性试验应尽可能涵盖试验水产动物可能摄入量 100 倍的剂量组。对于试验水产动物摄入量较大的受试物,高剂量可以按在饲料中的最大掺入量进行设计。

6.2 分组

至少应设 4 个剂量组和 1 个对照组。受试物如果是配合饲料,直接饲喂,不设剂量组。需要另外设计对照组。每组不少于 6 个重复,每个重复至少 30 个个体。

7 操作步骤

7.1 受试物的处理

将受试物粉碎至所要求的粒度(全部通过筛孔 0.28 mm 分样筛或更高细度),粒度的测定方法符合 GB/T 5917.1。根据受试物试验剂量的设计,把受试物添加到试验动物的配合饲料中,液体受试物按照试验剂量直接添加到其他原料的混合物中。充分混合,适当加工,制成营养组成、适口性、水中稳定性、粒径等特性都符合试验目的和试验动物要求的试验饲料,减少受试物以外的因素对试验动物的影响。受试配合饲料直接饲喂。对某一种受试物进行评价时,要考虑到饲料配方中是否存在其他拮抗或协同作用的成分。在确定配方前分析相关原料常规营养成分,并分析其卫生指标,结果应符合 GB 13078 和 NY 5072 的要求。

7.2 受试物的给予

7.2.1 途径

用含有受试物的试验饲料或受试饲料喂养试验水产动物(应注意受试物在饲料中的稳定性)。当受试物添加到饲料中时,需将受试物剂量按每 100g 试验水产动物体重的摄入量折算为饲料的量(mg/kg)。

7.2.2 试验动物空腹处理

试验水产动物在开始及结束前应空腹 24 h。

7.2.3 试验周期

根据大部分水产养殖鱼类的生长特性和养殖周期,规定试验周期至少为 24 周。

7.3 试验条件

7.3.1 试验系统

对于水溶性受试物的安全性评价应使用流水养殖系统,对于非水溶性受试物的安全性评价使用流水养殖系统或循环水养殖系统均可,养殖容器材料应无毒无害。废水排放要符合国家有关环保规定。

7.3.2 养殖条件

试验期间要保持养殖系统水温、流速、光照条件及养殖密度等条件处于受试水产动物最适生长要求范围。

7.3.3 水质条件

养殖过程中的水质应参照 GB 11607 的要求。

7.3.4 试验管理

正式试验开始时应对试验动物的初始体重进行称量。为减小对水产动物的刺激,试验动物应带水称重,再将带水重量减去容器与水的重量获得试验动物的重量。各试验组水产动物的初始体重要求尽量接近,统计差异不显著。

试验水产动物要定时定量或表现饱食投喂,详细记录投喂量及残饵量,测定饲料的溶失率以准确计算试验水产动物的摄食量。

试验结束时称重、取样,必要时使用适当的麻醉剂(参见附录 A),以降低各种操作的应激作用。

7.4 观察指标

7.4.1 摄食、生长、饲料利用及存活指标

每天观察并记录试验动物的一般表现、行为、中毒表现、摄食和死亡等情况。试验结束时对试验动物进行称重。按 3.8~3.14 评价终末体重、摄食率、饲料转化比、增重率、特定生长率、存活率等指标。

7.4.2 血液学指标

试验结束时,测定受试动物血红蛋白、红细胞计数、白细胞计数及分类、红细胞比容。依受试物情况,必要时测定其他相应指标。

7.4.3 血液生化指标

试验结束时,测定血清的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、尿素氮(BUN)、血糖(Glu)、总蛋白(TP)、总胆固醇(TCH)和甘油三酸酯(TG)。依受试物情况,必要时测定其他相应指标。

7.4.4 免疫和抗氧化指标

试验结束时,测定血清或血浆的溶菌酶、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)。依受试物情况,必要时测定其他相应指标。

7.4.5 病理检查

7.4.5.1 大体解剖

试验结束时应对所有试验水产动物进行解剖检查,并对代谢器官(肝脏或肝胰腺和肾)及残留或蓄积毒性靶器官组织(如皮肤,脑)固定保存,性成熟试验动物还需要将生殖器官组织固定保存,制作病理切片。

7.4.5.2 脏器称重

测定内脏、肝脏(或肝胰腺)的绝对重量和相对重量(内脏比和肝/体比值)。脏器的绝对重量测定时应将分离的内脏、肝脏用滤纸等试验材料除去水分。

7.4.5.3 组织病理学检查

在对各剂量组动物做解剖观察未发现明显病变和未发现生化指标异常后,对最高剂量组及对照组动物主要脏器进行组织病理学检查,发现病变后再对较低剂量组相应器官及组织进行检查。肝、肾及其他蓄积靶器官的组织病理学检查为必查项目,其他组织和器官的检查则需根据不同情况确定。

7.4.6 繁殖性能

如受试物可能在水产养殖动物的繁殖期饲料中应用,则需要按照 GB/T 23389 进行受试物对试验动物繁殖性能和后代影响的试验。

7.4.7 残留和蓄积试验

如受试物和(或)有毒代谢物(包括中间代谢产物、降解产物和其他结合物)可能在水产动物机体中残留或蓄积,并对试验水产动物、环境和人类食用安全造成潜在毒性,需要按照 GB/T 23388,对试验动物肌肉、代谢器官(肝脏和肾脏)和其他蓄积靶器官中来源于受试物中有毒有害成分的残留物进行检测,揭示受试物和(或)有毒代谢物在组织中的代谢和消除规律。

7.4.8 其他指标

必要时,根据受试物的性质及所观察的毒性反应,增加其他敏感指标。

8 数据处理

将所有观察到的结果都应进行统计学分析和评价,并用方差分析比较各剂量组与对照组间各指标的差异,以显示其毒性作用。

9 试验报告

对照组饲料应符合试验水产动物的营养需求,对照组试验水产动物生长指标达到或接近正常生产水平,存活率应不低于 90%。

报告应阐明试验设计、试验方法、毒性表现,确定 NOAEL 和 MATC。可结合繁殖、残留和蓄积毒性结果,为受试物能否应用于水产饲料以及确定其安全限量提供参考依据。

附 录 A
(资料性附录)

慢性毒性试验常用麻醉剂及使用剂量

表 A.1 慢性毒性试验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	无色至淡黄色液体,在空气中变棕色,有强烈的丁香气味。极易溶于水,溶于乙醇、乙醚、三氯甲烷和精油	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