



中华人民共和国国家标准

GB/T 21035—2025

代替 GB/T 21035—2007



饲料安全性评价 致畸试验

Feed safety assessment—Teratogenicity test

2025-06-30 发布

2026-01-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 21035—2007《饲料安全性评价 喂养致畸试验》，与 GB/T 21035—2007 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了部分术语和定义(见第3章)；
- b) 增加了试验原理(见第4章)；
- c) 增加了溶液配制(见第5章)；
- d) 增加了仪器设备的种类(见第6章)；
- e) 增加了受试物(见第7章)；
- f) 增加了试验动物的性别、数量和体重要求，并增加了种、系选择的要求(见8.1)；
- g) 增加了动物饲养要求(见8.3)；
- h) 增加了剂量分组的具体细节和要求，如剂量选择的依据、母体动物死亡率等(见第9章)；
- i) 增加了受试物配制方法和给予体积(见10.1.1)；
- j) 更改了传统致畸试验中给予大鼠受试物的方法(见10.1.1,2007年版的8.1)；
- k) 增加了母体观察和称重(见10.3)；
- l) 增加了“表1 活胎外观检查项目”“表2 胎仔骨骼常见异常情况”和“表3 胎仔器官常见异常情况”(见10.4)；
- m) 更改了标本制作的方法细节(见10.4.3,2007年版的8.6)；
- n) 增加了胎鼠不同位置切面图(见10.4.4)；
- o) 增加了试验报告(见第12章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本文件起草单位：中国农业大学、华中农业大学、湖南农业大学、乐山师范学院、中国兽医药品监察所、中国农业科学院质量标准化研究所、阿坝藏族羌族自治州畜牧科学技术研究所、四川省阿坝州金川多勒牦牛有限公司。

本文件主要起草人：程林丽、沈建忠、汤树生、齐德生、王旭、曾建国、刘秀斌、刘兆颖、杨秀玉、宋荣、魏书玲、林涛、杜瑞良、贺晓云、雷艳敏、杨文军、张燕、申文兵、孙鸿强。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2007年首次发布为 GB/T 21035—2007；

——本次为第一次修订。

饲料安全性评价 致畸试验

1 范围

本文件界定了饲料安全性评价致畸试验的相关术语,描述了试验原理、试剂及溶液配制、仪器设备、受试物、实验动物及饲养管理、剂量分组、操作步骤、数据处理和结果评价,规定了试验报告内容要求。
本文件适用于饲料和饲料添加剂的致畸性评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测
- GB/T 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准
- GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

发育毒性 developmental toxicity

个体在出生前暴露于受试物、发育成为成体之前(包括胚期、胎期以及出生后)出现的发育生物体的结构异常、生长改变、功能缺陷或死亡等有害作用。

3.2

致畸性 teratogenicity

受试物在妊娠的关键时期(尤其是器官发生期间),引起子代永久性结构异常的性质。

3.3

母体毒性 maternal toxicity

受试物引起亲代妊娠动物直接或间接的健康损害效应,引起增重减少、功能异常、中毒体征,甚至死亡的毒性。

3.4

分娩率 parturition index

分娩获得的活仔的动物数占妊娠动物数的百分比。

3.5

死胎率 fetal mortality

死胎仔数占胎仔总数的百分比。

3.6

畸胎总数 sum of terata

出现畸形的所有活胎仔数。

3.7

畸胎出现率 incidence of terata

畸胎总数占活胎总数的百分比。

3.8

单项畸形出现率 incidence of single teratosis

出现某种畸形的活胎仔数占活胎仔总数的百分比。

3.9

畸形种类数 sum kinds of teratosis

所有活胎仔出现的各种畸形种类数。

3.10

活胎仔平均畸形出现率 mean incidence of teratosis

畸形总数占活胎仔总数的百分比。

3.11

母体畸胎出现率 incidence of terata parturition

分娩畸胎的母体数占妊娠母体总数的百分比。

3.12

半数致死量 median lethal dose; LD₅₀

在规定时间内,通过指定途径,使一定体重或年龄的某种动物半数死亡所需受试品的剂量。

3.13

无可见有害作用水平 no observed adverse effect level; NOAEL

在规定的试验条件下,用现有的技术手段或检测指标未见到任何与受试物有关的毒性作用的最大染毒剂量或浓度。

3.14

最小可见损害作用水平 minimum observed adverse effect level; LOAEL

在规定的暴露条件下,通过实验和观察,一种物质引起实验动物某种有害作用的最低剂量或浓度。

4 试验原理

母体在孕期受到可通过胎盘屏障的某种有害物质作用,影响胚胎的器官分化与发育,导致结构异常,出现胎仔畸形。通过在受孕动物胚胎的器官形成期给予受试物,检出该物质对胎仔的致畸作用。

5 试剂及溶液配制

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.1 水:GB/T 6682,二级。

5.2 乙醇固定液:95%(体积分数)乙醇溶液。

5.3 鲍因(Bouins)固定液:分别量取饱和苦味酸溶液(2,4,6-三硝基酚饱和液)750 mL、40%甲醛250 mL和冰乙酸50 mL,混匀。

5.4 10 g/L 氢氧化钾溶液:称取1.0 g 氢氧化钾,加水溶解并稀释至100 mL,混匀。

5.5 20 g/L 氢氧化钾溶液:称取2.0 g 氢氧化钾,加水溶解并稀释至100 mL,混匀。

5.6 茜素红(alizarin red)贮备溶液:将0.2 g 以上的茜素红加入5 mL 乙酸、10 mL 纯甘油和60 mL 1%水合氯醛的混合液中至饱和,避光保存。

5.7 茜素红应用液 I:取茜素红贮备液(5.6)3 mL~5 mL,用氢氧化钾溶液(5.4 或 5.5)稀释至

1 000 mL。按照染色效果确定茜素红贮备液的体积和氢氧化钾溶液的质量浓度,临用现配,。

5.8 茜素红应用液Ⅱ:称取茜素红 0.1 g,氢氧化钾 10 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL,混匀,临用现配。

注:茜素红应用液Ⅱ采用剥皮法进行骨骼染色的染色液。

5.9 脱水透明液 A:甘油 200 mL、氢氧化钾溶液(5.5)30 mL,加水至 1 000 mL,混匀。

5.10 脱水透明液 B:甘油 500 mL、氢氧化钾溶液(5.5)30 mL,加水至 1 000 mL,混匀。

6 仪器设备

6.1 放大镜:放大倍数为 8 倍~10 倍。

6.2 解剖显微镜:7 倍~220 倍。

6.3 光学显微镜:40 倍~1600 倍。

6.4 体视显微镜:7.8 倍~160 倍。

6.5 分析天平:精度为 0.001 g。

6.6 游标卡尺(百分尺):精度通常为 0.02 mm。

7 受试物

受试物应采用制备工艺稳定、符合质量标准规定的原始样品,如不能直接使用原始样品,应对受试物进行相应处理。

8 实验动物及饲养管理

8.1 实验动物

8.1.1 种、系选择

实验动物的选择应符合 GB 14922 的有关规定。首选啮齿类大鼠,在推荐需要采用第二种哺乳动物时非啮齿类首选家兔。若选用其他物种应给出理由。选用健康、性成熟的雄性动物和未经交配的雌性动物,试验开始时动物体重的差异不应超过平均体重的 $\pm 20\%$ 。雌性应和与其交配的雄性属于相同的种属和品系。所用动物应注明种类、品系、性别、体重和周龄。

8.1.2 动物性别和数量

性成熟雄性和雌性动物通常按 1:1 或 1:2 比例合笼交配,如果 5 d 内未交配,应更换雄性动物。大鼠每个剂量水平的妊娠动物数不少于 20 只,家兔每个剂量水平的妊娠动物数不少于 12 只。

8.2 动物准备

试验前动物在实验动物房至少适应性饲养 3 d~5 d。

8.3 饲养管理

8.3.1 饲养条件应符合 GB 14925 规定。

8.3.2 饲料符合 GB/T 14924.1 规定。

8.3.3 试验期间动物自由饮水和摄食,妊娠动物应单笼饲养。

9 剂量分组

9.1 剂量组设置

试验至少设 4 组,其中受试物设 3 个剂量组,另设一个空白对照组或溶剂对照组。溶剂对照组除不给受试物外,其余处理均同剂量组。必要时还要设阳性对照组。剂量一般选择在 $1/10 \sim 1/100$ 母体 LD_{50} 之间。 LD_{50} 主要通过动物实验获得。高剂量组原则上使部分动物出现某些发育毒性和/或母体毒性,如体重轻度减轻等,但不至于引起死亡或严重毒性,如果母体动物有死亡发生,应不超过母体动物数量的 $1/10$ 。低剂量不应出现任何观察到母体毒性或发育毒性。在高剂量组与低剂量组之间设 1 个~2 个中剂量组,递减剂量系列的间距为 2 倍~4 倍。当组间差距较大时(如超过 10 倍),增加一个剂量组。

9.2 试验剂量的设计

参考急性毒性试验剂量、28 d 经口毒性试验剂量、90 d 经口毒性试验剂量进行。对于能求出 LD_{50} 的受试物,根据 LD_{50} 值和剂量-反应关系曲线斜率设计高剂量组的剂量。对于求不出 LD_{50} 的受试物,如果 28 d 或 90 d 经口毒性试验未观察到有害作用,以最大无作用剂量作为高剂量;如果 28 d 或 90 d 经口试验观察到有害作用,以最大无作用剂量为高剂量组,并往下再设 2 个剂量组。设置剂量水平时还应参考受试物的其他毒理学资料。

对于毒性很低的受试物,也可以 $1 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 为最大染毒剂量、生殖毒性方面的最大无作用剂量为最低给药剂量。

10 操作步骤

10.1 受试物给予

10.1.1 受试物给予方式

受试物通常经口灌胃给予,若选用其他途径应说明理由。在器官形成期给予受试物(大鼠孕期第 6 天~第 15 天,兔孕期的第 6 天~第 18 天)。雄性动物无需给药。

10.1.2 受试物配制方法及灌胃体积

经口灌胃时,要将受试物溶解或悬浮于合适的溶剂中,首选溶剂为水,不溶于水的受试物可使用植物油(如橄榄油、玉米油等),不溶于水或油的受试物可使用羧甲基纤维素、淀粉和水配成混悬液或糊状物等。灌胃受试物应临用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。应每日在同一时间灌胃 1 次,根据母体体重调整灌胃体积。

灌胃体积一般每千克体重不超过 10 mL。受试物的水溶液最大灌胃体积每千克体重可达 20 mL;受试物的油溶液灌胃体积每千克体重应不超过 4 mL;各组灌胃体积一致。

10.2 受孕检查

10.2.1 大小鼠:雌雄同笼后,每日早晨检查笼底有无阴道栓(石蜡状圆柱体)或用浸湿生理盐水的棉签取阴道分泌物涂布于滴有 1 滴生理盐水的玻片上,置于低倍显微镜下检查有无精子。发现阴道栓或精子的当天定为孕期 0 d。

10.2.2 家兔:雌雄同笼后阴道涂片检查到精子当日作为“受孕”0 d。

10.2.3 将检出的“受孕动物”随机分到各组,并称重和编号。与相同雄性交配的雌性,应均匀分至不同组。

10.3 母体观察和称重

10.3.1 每日对动物进行临床观察,包括皮肤、被毛、眼睛、黏膜、呼吸、神经行为、四肢活动等情况,及时记录各种中毒体征,包括发生时间、表现程度和持续时间,发现虚弱或濒死的动物应进行隔离或处死,母体有流产或早产征兆时应及时剖检。

10.3.2 在受孕第 0 天、给予受试物第 1 天、给予受试物期间每 3 天及处死当日称母体体重,以观察受孕动物的体重变化,随时观察记录母体状况。同时记录摄食量,其记录间隔与体重一致。

10.4 受孕母体处死和检查

10.4.1 一般检查

分娩前 1 天(一般大小鼠为孕第 20 天、家兔为孕第 28 天)处死母体,沿腹中线剖开腹腔,检查亲代受孕情况和胚胎发育。迅速取出子宫,称量子宫连胎重,得出妊娠动物的净增重。记录黄体数、早死胎数、晚死胎数、活胎数和着床数。应描述再吸收程度(早、晚)以估计孕体的相对死亡时间。

看似无妊娠的子宫应进一步检查(例如,啮齿动物通过硫化胺染色;家兔通过 Salewski 染色或其他适合的替代方法)以证明未怀孕状态或胚胎死亡。

处死时对所有妊娠动物进行尸检和肉眼检查,保存肉眼发现有改变的脏器,以便于进行组织学检查,同时保存足够对照组的相应脏器以供比较。

10.4.2 胎仔检查(以胎鼠为例)

逐个记录活胎鼠体重、性别、体长。外观检查头颅外形、面部、躯干、四肢等有无畸形,包括露脑、脑膨出、眼部畸形(小眼、无眼、睁眼等)、鼻孔扩大,单鼻孔、唇裂、脊柱裂,四肢及尾畸形等。活胎外观检查项目见表 1。

表 1 活胎外观检查项目

部位	检查项目	部位	检查项目	部位	检查项目
头部	无脑	躯干部	胸骨裂	四肢	多肢
	脑膨出		胸部裂		无肢
	顶骨裂		脊椎裂		短肢
	脑积水		腹裂		半肢
	小头症		脊椎侧弯		多趾
	颜面裂		脊椎后弯		无趾
	小眼症		脐疝		并趾
	眼球突出		尿道下裂		短趾
	无耳症		无肛门		缺趾
	小耳症		短尾、卷尾		
	耳低位		无尾		
	无腭症				
	小腭症				
	下腭裂				
	口唇裂				

10.4.3 胎仔骨骼标本制作与检查(以胎鼠为例)

10.4.3.1 骨骼标本制作

10.4.3.1.1 方法一

将每窝 1/2 的活胎放入乙醇固定液(5.2)中固定 2 周~3 周,取出胎仔,流水冲洗数分钟后放入氢氧化钾溶液(5.4 或 5.5)内(至少 5 倍于胎仔体积)8 h~72 h,透明后放入茜素红应用液 I (5.7)中染色 6 h~48 h,并轻摇 1 次/d~2 次/d,至头骨染红为宜。再放入透明液 A 中 1 d~2 d,放入透明液 B (5.10)中 2 d~3 d,待骨骼染红而软组织基本褪色。

10.4.3.1.2 方法二

将胎鼠去皮、去内脏及脂肪后,放入茜素红应用液 II (5.8)染色,当天摇动玻璃瓶 2 次~3 次,待骨骼染成红色时为止。将胎仔换入透明液 A(5.9)中 1 d~2 d,换入透明液 B(5.10)中 2 d~3 d。待胎鼠骨骼已染红,而软组织的紫红色基本褪去,可换置甘油中。

10.4.3.2 胎仔骨骼检查

将骨骼标本放入小平皿中,用透射光源,在体视显微镜下作整体观察,然后逐步检查骨骼。测量头顶间骨及后头骨缺损情况,然后检查胸骨的数目、缺失或融合,最后检查四肢骨。胎仔骨骼常见异常情况见表 2。

表 2 胎仔骨骼常见异常情况

部位	常见异常情况
枕骨	骨化中心缺失
脊椎骨	检查脊椎发育和椎体、形状异常、融合、纵裂、部分裂开、骨化中心缺失、缩窄、脱离
骨盆	骨化中心缺失、形状异常、融合、裂开、缩窄、脱离
四肢骨	数目增加或减少、形状异常
腕骨	骨化中心缺失
掌骨	形状异常
趾骨(指骨)	形状异常
肋骨	数目增加或减少(常见增加数目至 14 肋)、形状异常(如波状、变短、缺肋、肋骨中断、融合、分叉、缺损)
胸骨	数目、融合、骨化中心缺失(骨化不全时首先缺第 5 胸骨、次为缺第 2 胸骨)
注:正常骨颈椎 7 个、胸椎 12 个~13 个、腰椎 5 个~6 个、底椎 4 个、尾椎 3 个~5 个;肋骨通常 12 对~13 对;胸骨骨化中心为 5 个,剑突 1 块。	

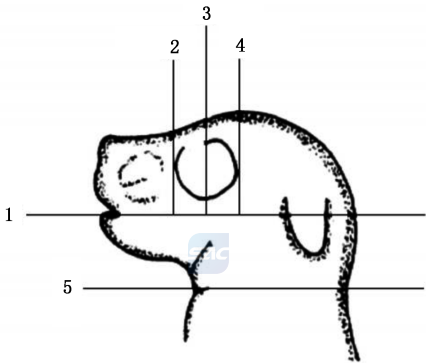
10.4.4 胎仔器官检查(以胎鼠为例)

将每窝 1/2 的胎鼠放入鲍因固定液(5.3)中,两周后做内脏检查。先用自来水冲去固定液,将鼠仰放在石蜡板上,剪去四肢和尾,用刀片从头部到尾部逐段横切或纵切 5 刀。观察不同切面器官的大小、形状和相对位置。具体致畸试验胎仔内脏检查项目切面制作见图 1~图 5。

- a) 经口从上腭与舌之间向枕部横切(切面 1),可观察大脑、间脑、正脑、舌及腭裂。
- b) 从眼眶前缘垂直纵切(切面 2),可观察鼻道、鼻中隔。

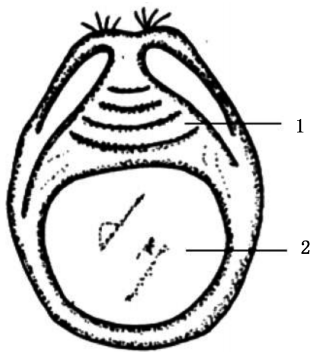
- c) 从头部经眼球中央垂直纵切(切面 3),可观察眼球、视网膜、嗅球。
- d) 从头部最大横位处纵切(切面 4),可观察大脑及脑室。
- e) 沿下颚水平穿过颈部横切(切面 5),可观察舌、咽、气管、食管和延髓,一般仅作辅助观察,不制作切面图。

以后自腹中线剪开胸、腹腔,依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的大小、位置,查毕将其摘除,再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫和睾丸位置及发育情况。然后将肾脏切开,观察有无肾盂积水与扩大等。胎仔器官常见异常情况见表 3。



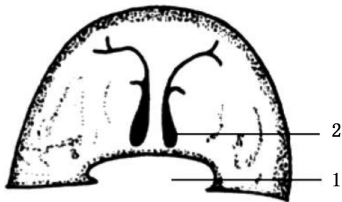
- 标引序号说明:
- 1——头部切面位置:上腭;
 - 2——头部切面位置:鼻道;
 - 3——头部切面位置:眼球;
 - 4——头部切面位置:脑室;
 - 5——颈部横切位置。

图 1 胎鼠切面制作示意图



- 标引序号说明:
- 1——上腭;
 - 2——脑。

图 2 头部第 1 切面图示——上腭



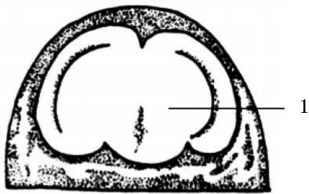
- 标引序号说明:
- 1——上腭;
 - 2——鼻腔。

图 3 头部第 2 切面图示——鼻道



标引序号说明：
1——眼球。

图 4 头部第 3 切面图示——眼球



标引序号说明：
1——脑。

图 5 头部第 4 切面图示——脑室

表 3 胎仔器官常见异常情况

部位	异常情况	部位	异常情况	部位	异常情况
头 部（脊 髓）	嗅球发育不全	胸部	主动脉弓	腹部	多囊肾
	侧脑室扩张		食道闭锁		马蹄肾
	第三脑室扩张		气管狭窄		肾积水
	无脑症		无肺症		肾缺失
	无眼球症		多肺症		膀胱缺失
	小眼球症		肺叶融合		睾丸缺失
	角膜缺损		膈疝		卵巢缺失
	单眼球		气管食管瘘		卵巢异位
			内脏异位		子宫缺失
			右位心		子宫发育不全
			房中隔缺损		输卵管积水
			室间隔缺损		肝分叶异常
					肾上腺缺失

对非啮齿类动物，如家兔，应对所有的胎仔均进行骨骼和内脏的检查，其检查程序参照大鼠进行。

11 数据处理和结果评价

11.1 数据处理

整理每只动物试验的原始记录并将试验结果列表，包括试验开始时体重、各试验组动物数，子代动物数、试验过程中死亡或人为处死的动物数、受孕动物数、临床中毒表现和出现中毒体征的动物数。胎仔的观察结果，包括畸形类型及其他相关信息。

11.2 统计参数和计算方法

用合理的统计方法对下述指标进行统计分析：母体体重、体重增重（处死时母体体重－孕 7 d 体重）、子宫连胎重、体重净增重（处死时母体体重－子宫连胎重－孕 7 d 体重）、活胎数、死胎数及死胎率、胎仔的体重及体长、畸形总数（包括外观、骨骼和内脏畸形）、畸胎总数，有畸形胎仔的窝数及畸胎出现率，计算分娩率、活胎仔平均畸形出现率、母体畸胎出现率和单项畸形出现率。

对胎仔的相关指标统计应以窝为单位,检测数据应进行统计学分析。

11.3 结果评价

通过试验数据和结果进行综合评价,描述其致畸症状。与其他毒性试验结果综合判定是否具有致畸性作用。活胎仔平均畸形出现率、母体畸胎出现率和单项畸形出现率、胎仔观察到的畸形类型等为致畸性作用的直接判断指标。胎仔分娩率、母体净增重、胎仔净增重等参数为致畸性作用的间接判断指标。

12 试验报告

试验报告中应包括但不限于以下信息:

- a) 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号;
- b) 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期;
- c) 试验开始和结束日期、试验项目负责人、试验单位技术负责人、签发日期;
- d) 试验摘要;
- e) 受试物名称、剂型、生产日期(批号)、外观性状、配制所用溶剂和方法;
- f) 实验动物种属、品系、级别、数量、体重、性别、来源(供应商名称、实验动物生产许可证号)、动物检疫、适应情况,饲养环境(温度、相对湿度、实验动物设施使用许可证号),饲料来源(供应商名称);
- g) 剂量和组别,包括选择剂量的原则或依据、剂量和组别、动物分组方式和每组动物数;
- h) 试验条件和方法,包括受试物给予方式和期限、试验周期、观察指标等;
- i) 试验结果:以文字描述和表格逐项进行汇总,包括母体体重、妊娠情况、活胎数、死胎数及百分率。胎仔的情况(体重、体长)、畸胎的类型(外观、骨骼和内脏)、数目及百分率,给出结果的统计处理方法(如在 5.0% 的检验水准下,有无统计学差异);
- j) 试验结论:根据观察到的效应和产生效应的剂量水平评价是否具有致畸性,及畸形的类型。给出致畸作用、其他发育毒性终点及母体毒性和最大无作用剂量。

