



中华人民共和国国家标准

GB 15193.22—2014

食品安全国家标准

28天经口毒性试验

2014-12-01 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

食品安全国家标准

28 天经口毒性试验

1 范围

本标准规定了实验动物 28 天经口毒性试验的基本试验方法和技术要求。

本标准适用于评价受试物的短期毒性作用。

2 术语和定义

2.1 重复剂量 28 天经口毒性

实验动物连续 28 天经口接触受试物后引起的健康损害效应。

2.2 未观察到有害作用剂量

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

2.3 最小观察到有害作用剂量

在规定的条件下,受试物引起实验动物组织形态、功能、生长发育等有害效应的最小作用剂量。

2.4 靶器官

实验动物出现由受试物引起明显毒性作用的器官。

2.5 卫星组

在毒性研究设计和实施中外加的动物组,其处理和饲养条件与主要研究的动物相似,用于试验中期或试验结束恢复期观察和检测,也可用于不包括在主要研究内的其他指标及参数的观察和检测。

3 试验目的和原理

确定在 28 天内经口连续接触受试物后引起的毒性效应,了解受试物剂量-反应关系和毒作用靶器官,确定 28 天经口最小观察到有害作用剂量(LOAEL)和未观察到有害作用剂量(NOAEL),初步评价受试物经口的安全性,并为下一步较长期毒性和慢性毒性试验剂量、观察指标、毒性终点的选择提供依据。

4 仪器和试剂

4.1 仪器/器械

实验室常用解剖器械、电子天平、生物显微镜、检眼镜、生化分析仪、血球分析仪、凝血分析仪、尿液分析仪、离心机、石蜡切片机等。

4.2 试剂

甲醛、二甲苯、乙醇、苏木素、伊红、石蜡、血球分析仪稀释剂、生化分析试剂、凝血分析试剂、尿液分析试剂等。

5 试验方法

5.1 受试物

受试物应使用原始样品,若不能使用原始样品,应按照受试物处理原则对受试物进行适当处理。将受试物掺入饲料、饮用水或灌胃给予。

5.2 实验动物

5.2.1 动物选择

实验动物的选择应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的有关规定。选择已有资料证明对受试物敏感的物种和品系,一般啮齿类动物首选大鼠,非啮齿类动物首选犬(通常选用 Beagle 犬)。大鼠周龄推荐不超过 6 周,体重 50 g~100 g。试验开始时每个性别动物体重的差异不应超过平均体重的±20%。每组动物数不少于 20 只,雌雄各半;若计划试验结束做恢复期的观察,应增加动物数(对照和高剂量增加卫星组,每组 10 只,雌雄各半)。犬应选用 4 个月~6 个月幼犬,试验开始时每个性别动物体重差异不应超过平均体重的±20%,每组动物数不少于 8 只,雌雄各半;若计划试验结束做恢复期的观察,应增加动物数(对照和高剂量增加卫星组,每组 4 只,雌雄各半)。对照组动物性别和数量应与受试物组相同。

5.2.2 动物准备

试验前大鼠在实验动物房至少应进行 3 d~5 d(犬 7 d~14 d)环境适应和检疫观察。

5.2.3 动物饲养

实验动物饲养条件应符合 GB 14925、饮用水应符合 GB 5749、饲料应符合 GB 14924 的有关规定。试验期间动物自由饮水和摄食,推荐单笼饲养,大鼠也可按组分性别分笼群饲,每笼动物数(一般不超过 3 只)应满足实验动物最低需要的空间,以不影响动物自由活动和观察动物的体征为宜。试验期间每组动物非试验因素死亡率应小于 10%,濒死动物应尽可能进行血液生化指标检测、大体解剖以及病理组织学检查,每组生物标本损失率应小于 10%。

5.3 剂量

5.3.1 分组

试验至少设 3 个受试物剂量组,1 个阴性(溶媒)对照组,必要时增设未处理对照组。若试验结束做恢复期观察,对照和高剂量需增设卫星组。对照组除不给受试物外,其余处理均同受试物剂量组。

5.3.2 剂量设计

5.3.2.1 原则上高剂量应使部分动物出现比较明显的毒性反应,但不引起死亡;低剂量不宜出现任何观察到毒效应(相当于 NOAEL),且高于人的实际接触水平;中剂量介于两者之间,可出现轻度的毒性效应,以得出 LOAEL。一般递减剂量的组间距以 2 倍~4 倍为宜,如受试物剂量总跨度过大,可加设剂量组。试验剂量的设计参考急性毒性 LD₅₀ 剂量和人体实际摄入量进行。

5.3.2.2 能求出 LD₅₀的受试物,以 LD₅₀的 10%~25%作为 28 天经口毒性试验的最高剂量组,此 LD₅₀百分比的选择主要参考 LD₅₀剂量-反应曲线的斜率。然后在此剂量下设几个剂量组,最低剂量组至少是人体预期摄入量的 3 倍。

5.3.2.3 求不出 LD₅₀的受试物,试验剂量应尽可能涵盖人体预期摄入量 100 倍的剂量,在不影响动物摄食及营养平衡前提下应尽量提高高剂量组的剂量。对于人体拟摄入量较大的受试物,高剂量组亦可以按最大给予量设计。

5.4 试验步骤和观察指标

5.4.1 受试物给予

5.4.1.1 根据受试物的特性和试验目的,选择受试物掺入饲料、饮水或灌胃方式给予。若受试物影响动物适口性,应灌胃给予。受试物应连续给予 28 天。

5.4.1.2 受试物灌胃给予,要将受试物溶解或悬浮于合适的溶媒中,首选溶媒为水、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亦可使用羧甲基纤维素、淀粉等配成混悬液或糊状物等。受试物应现用现配,有资料表明其溶液或混悬液储存稳定者除外。应每日在同一时段灌胃 1 次,每周称体重 2 次,根据体重调整灌胃体积。灌胃体积一般不超过 10 mL/kg 体重,如为水溶液时,最大灌胃体积大鼠可达 20 mL/kg 体重,犬 15 mL/kg 体重;如为油性液体,灌胃体积应不超过 4 mL/kg 体重;各组灌胃体积一致。

5.4.1.3 受试物掺入饲料或饮水给予,要将受试物与饲料(或饮水)充分混匀并保证该受试物配制的稳定性和均一性,以不影响动物摄食、营养平衡和饮水量为原则,受试物掺入饲料比例一般小于质量分数 5%,若超过 5%时(最大不应超过 10%),调整对照组饲料营养素水平(若受试物无热量或营养成分,且添加比例大于 5%时,对照组饲料应填充甲基纤维素等,掺入量等同高剂量),使其与受试物组饲料营养素水平保持一致,同时增设未处理对照组;亦可视受试物热量或营养成分的状况调整受试物剂量组饲料营养素水平,使其与对照组饲料营养素水平保持一致。受试物剂量单位是每千克体重所摄入受试物的毫克(或克)数,即 mg/kg 体重(或 g/kg 体重),当受试物掺入饲料其剂量单位亦可表示为 mg/kg(或 g/kg)饲料,掺入饮水则表示为 mg/mL 水。受试物掺入饲料时,需将受试物剂量(mg/kg 体重)按动物每 100 g 体重的摄食量折算为受试物饲料浓度(mg/kg 饲料),一般 28 天经口毒性试验大鼠每日摄食量按体重 10%折算。

5.4.2 一般临床观察

观察期限为 28 d,若设恢复期观察,动物应停止给予受试物后继续观察 14 d,以观察受试物毒性的可逆性、持续性和迟发效应。试验期间至少每天观察一次动物的一般临床表现,并记录动物出现中毒的体征、程度和持续时间及死亡情况。观察内容包括被毛、皮肤、眼、黏膜、分泌物、排泄物、呼吸系统、神经系统、自主活动(如:流泪、竖毛反应、瞳孔大小、异常呼吸)及行为表现(如:步态、姿势、对处理的反应、有无强直性或阵挛性活动、刻板反应、反常行为等)。对体质弱的动物应隔离,濒死和死亡动物应及时解剖。

5.4.3 体重和摄食及饮水消耗量

每周记录体重、摄食量,计算食物利用率;试验结束时,计算动物体重增长量、总摄食量、总食物利用率。受试物经饮水给予,应每日记录饮水量。如受试物经掺入饲料或饮水给予,应计算和报告受试物各剂量组实际摄入剂量。

5.4.4 眼部检查

试验前和试验结束时,至少对高剂量组和对照组实验动物进行眼部(角膜、球结膜、虹膜)检查,犬用

荧光素钠进行检查,若发现高剂量组动物有眼部变化,则应对所有动物进行检查。

5.4.5 血液学检查

大鼠试验结束、恢复期结束(卫星组)进行血液学指标测定;犬试验前、试验结束、恢复期结束(卫星组)进行血液学指标测定。推荐指标为白细胞计数及分类(至少三分类)、红细胞计数、血红蛋白浓度、红细胞压积、血小板计数、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)等。如果对血液系统有影响,应加测网织红细胞、骨髓涂片细胞学检查。

5.4.6 血生化检查

大鼠试验结束、恢复期结束(卫星组)进行血液生化指标测定;犬试验前、试验结束、恢复期结束(卫星组)进行血液生化指标测定,应空腹采血。测定指标应包括电解质平衡、糖、脂和蛋白质代谢、肝(细胞、胆管)肾功能等方面。至少包含丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转肽酶(GGT)、碱性磷酸酶(AKP)、尿素(Urea)、肌酐(Cre)、血糖(Glu)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、氯、钾、钠指标。必要时可检测钙、磷、尿酸(UA)、胆碱酯酶、山梨醇脱氢酶、总胆汁酸(TBA)、高铁血红蛋白、激素等指标。应根据受试物的毒作用特点或构效关系增加检测内容。

5.4.7 尿液检查

大鼠在试验结束、恢复期结束(卫星组)时进行尿液常规检查,犬试验前、试验结束、恢复期结束(卫星组)进行尿液常规检查。包括尿蛋白、相对密度、pH、葡萄糖和潜血等。若预期有毒反应指征,应增加尿液检查的有关项目如尿沉渣镜检、细胞分析等。

5.4.8 体温、心电图检查

犬试验前、试验结束、恢复期结束(卫星组)应进行体温、心电图检查。

5.4.9 病理检查

5.4.9.1 大体解剖

试验结束时必须对所有动物进行大体检查,包括体表、颅、胸、腹腔及其脏器,并称心脏、胸腺、肾上腺、肝、肾、脾、睾丸的绝对重量,计算相对重量(脏/体比值)。

5.4.9.2 组织病理学检查

可以先对最高剂量组和对照组动物进行以下脏器组织病理学检查,发现病变后再对较低剂量组相应器官及组织进行检查。检测脏器应包括脑、甲状腺、胸腺、心脏、肝、脾、肾、肾上腺、胃、十二指肠、结肠、胰、肠系膜淋巴结、卵巢、睾丸、膀胱,必要时可加测脊髓(颈、胸、腰)、垂体、食道、空肠、回肠、直肠、唾液腺、颈淋巴结、气管、肺、动脉、子宫、乳腺、附睾、前列腺、骨和骨髓、坐骨神经和肌肉、皮肤和眼球等组织器官。对肉眼可见的病变或可疑病变组织进行病理组织学检查,出具组织病理学检查报告,病变组织给出病理组织学照片。

5.4.10 其他指标

必要时,根据受试物的性质及所观察的毒性反应,增加其他指标(如神经毒性、免疫毒性、内分泌毒性指标)。

6 数据处理和结果评价

6.1 数据处理

应将所有的数据和结果以表格形式进行总结,列出各组开始前的动物数、试验期间动物死亡数及死亡时间、出现毒性反应的动物数,列出所见的毒性反应,包括出现毒效应的时间、持续时间及程度。对计量资料给出均数、标准差。对动物体重、摄食量、饮水量(受试物经饮水给予)、食物利用率、血液学检查、血生化检查、尿液检查、脏器重量和脏体比值、病理检查等结果应以适当的方法进行统计学分析。一般情况,计量资料采用方差分析,进行多个试验组与对照组之间均数比较,分类资料采用 Fisher 精确分布检验、卡方检验、秩和检验,等级资料采用 Ridit 分析、秩和检验等。

6.2 结果评价

应将临床观察、生长发育情况、血液学检查、血生化检查、尿液检查、大体解剖、脏器重量和脏体比值、病理组织学检查等各项结果,结合统计结果进行综合分析,初步判断受试物毒作用特点、程度、靶器官、剂量-效应、剂量-反应关系,如设有恢复期卫星组,还可判断受试物毒作用的可逆性。在综合分析的基础得出 28 天经口毒性 LOAEL 和(或)NOAEL。初步评价受试物经口的安全性,并为进一步的毒性试验提供依据。

7 试验报告

7.1 试验名称、试验单位名称和联系方式、报告编号。

7.2 试验委托单位名称和联系方式、样品受理日期。

7.3 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。

7.4 试验摘要。

7.5 受试物:名称、批号、剂型、状态(包括感官、性状、包装完整性、标识)、数量、前处理方法、溶媒。

7.6 实验动物:物种、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、实验动物饲料生产许可证号)。

7.7 试验方法:试验分组、每组动物数、剂量选择依据、受试物给予途径及期限、观察指标、统计学方法。

7.8 试验结果:动物生长活动情况、毒性反应特征(包括出现的时间和转归)、体重增长、摄食量、食物利用率、眼部检查、血液学检查、血生化检查、尿液检查、大体解剖、脏器重量和脏体比值、病理组织学检查结果。如受试物经掺入饲料或掺入饮水给予,报告各剂量组实际摄入剂量。

7.9 试验结论:受试物 28 天经口毒作用的特点,剂量反应关系,靶器官和可逆性。并得出 28 天经口毒性 NOAEL 和(或)LOAEL 结论等。

8 试验的解释

28 天经口毒性试验能提供受试物在较短时间内重复给予引起的毒性效应,毒作用特征及靶器官等有关资料。由于动物和人存在物种差异,试验结果外推到人有一定的局限性,但可为初步估计人群允许接触水平提供有价值的信息。