

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21826—2008

## 化学品 急性经口毒性试验方法 上下增减剂量法(UDP)

Chemicals—Test method of acute oral toxicity—  
Up-and-down-procedure(UDP)



080927000231

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

2008年10月17日上午

## 前 言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试方法 No. 425(2006 年)《急性经口毒性——上下增减剂量法(UDP)》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改:

——文本格式上按 GB/T 1.1—2000 做了编辑性修改;

——增加了“OECD 引言”部分,把 OECD 化学品测试方法 No. 425 中的试验须知部分内容纳入“OECD 引言”中;

——增加了“范围”一章;

——OECD 化学品测试方法 No. 425 附录(定义)部分改为本标准第 2 章“术语和定义”;

——删除了 OECD 化学品测试方法 No. 425 的“参考文献”大部分。

本标准附录 A 和附录 C 为规范性附录、附录 B 为资料性附录。

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:深圳出入境检验检疫局。

本标准参加起草单位:广东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:刘志红、李彬、刘丽、刘贤杰、陈向阳、王宏菊、陈美容、李智儒、刘宇泓、陈强、许崇辉。

## OECD 引言

### 引言

经济合作与发展组织(OECD)化学品测试指南按照科学的进展或者改变评估惯例进行阶段性评论。上下增减剂量法最初是由 Dixon 和 Mood 提出。1985 年, Bruce 建议使用上下增减剂量法(UDP)测定化学品急性毒性。上下增减剂量法中  $LD_{50}$  的实验设计有几次变更。本指南是基于 Bruce 提出的测试方法, 该测试方法 1987 年被 ASTM 采纳, 并于 1990 年进行了修订。1995 年发表了使用 UDP、传统  $LD_{50}$  测试方法和固定剂量法(FDP, OECD 测试指南 420)三种方法得到的研究结果。从 Dixon 和 Mood 早期的论文开始, 很多使用这些方法进行条件优化的研究相继出现在生物和应用论文里。基于 1999 年几次专家会议上的建议, 因以下原因需对方法进行及时修订: i) 国际上在使用协调  $LD_{50}$  分界值对化学品进行分级的问题上已达成共识; ii) 一般认为测试一种性别(通常是雌性)足够了; iii) 为了使单点评估更有意义, 需对置信区间(CI)进行评估。

本指南文件中给出的测试程序旨在以最小量的动物测出化学品的急性经口毒性。除了评价  $LD_{50}$  和置信区间, 试验中还观察毒性表现, 测试指南 425 和 420、430 的修订是同时进行的。

在指南文件经口毒性测试部分可以选择一个最合适的测试方法来进行某个特定目标的测试。该指南文件还包括对指南文件 425 执行和解释的附加信息。

### 试验须知

实验室在进行试验之前应该考虑可得到的受试物的所有信息。信息包括受试物的识别和化学结构; 物理化学性质; 受试物的任何活体外或活体内毒性试验结果; 结构相关物质或相似化合物的毒理学数据; 还包括受试物的预期使用信息。该信息有助于推断在人体健康和环境保护试验方面的相关性, 另外还有助于选择合适的起始剂量。

本方法允许对  $LD_{50}$  的评估附带一个置信区间, 根据化学品分类及标记全球协调制度中急性毒性化学品的分类标准, 依据这些试验结果可以对物质进行定级和分类。

当没有任何信息对  $LD_{50}$  和剂量-反应曲线斜率进行初步评价时, 建议使用计算机模拟结果, 从 175 mg/kg 附近开始, 利用剂量的半对数单位(对应剂量级数因子 3.2)可以产生最好的结果。如果物质可能是高度毒性的, 则应对该起始剂量进行修正。采用半对数间距可以较高效率的使用动物, 增加了预测  $LD_{50}$  的准确性。由于本方法对起始剂量有偏倚, 故初始剂量的选择一定要低于估计的  $LD_{50}$ 。然而, 与其他急性毒性方法相似, 对可变性大的化学品(如, 低的剂量-反应曲线斜率)致死量的评估还是会引入偏差,  $LD_{50}$  会有一个大的统计误差。主要试验部分中的停止规则可以对此进行校正, 停止规则不仅仅是一个试验观察的固定数量(见 5.3.2.2.3), 它对评估的准确性也是很关键的。

本方法较易适用于染毒后一天或两天内就引起死亡的物质。而不适用于染毒后可能发生迟发性死亡(5 d 或以上)的物质。

计算机建立了试验顺序并提供了最终评估, 简化了逐个动物的计算。

如果知道受试物在某个剂量有腐蚀或严重刺激行为而导致显著疼痛, 则不需要实施试验。应人道处死濒死的动物或明显痛苦或表现出严重和持久疼痛的动物, 应等同于实验中死亡的动物对试验结果进行解释。

限量试验可有效应用于低毒性的化学品。

# 化学品 急性经口毒性试验方法

## 上下增减剂量法(UDP)

### 1 范围

本标准规定了化学品急性经口毒性试验方法——上下增减剂量法(UDP)的范围、术语和定义、试验原则、试验方法、数据和报告。

本标准适用于化学品急性经口毒性试验方法——上下增减剂量法(UDP)。

### 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。

ASTM E 1163—1987 评定剧毒口服灭鼠剂试验方法

### 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**

将受试物在 24 h 内给受试动物一次经口染毒或多次经口染毒后所产生的有害效应。

#### 3.2

**延迟死亡 delayed death**

48 h 内受试动物不引起死亡或出现濒死状态,但在 14 d 的观察期间内出现死亡。

#### 3.3

**剂量 dose**

受试动物进行染毒试验时给予受试物的量,以质量(g,mg)来表示,或以动物每单位体重的受试物量来表示(如 mg/kg)。

#### 3.4

**剂量级数因子 dose progression factor**

有时被称为剂量步进因子。是指当一只动物存活时,下一只动物增加成倍剂量(即剂量级数);或当一只动物死亡时,下一只动物成倍减少剂量。剂量级数因子建议为  $1/(\text{估计的剂量-反应曲线斜率})$  的对数。默认的剂量级数因子为 3.2,即 0.5 或  $1/2$  的反对数。

#### 3.5

**化学品分类及标记全球协调制度(GHS) globally harmonised classification system for chemical substances and mixtures**

化学品分类及标记全球协调制度,是经济合作与发展组织(OECD)(人类健康和环境),联合国危险货物运输专家委员会(UNCETDG)(理化特性)和国际劳工组织(ILO)(危险货物运输信息传递)的联合行动。并与化学品有效管理机构间规划组织(IOMC)协调一致。

#### 3.6

**临近死亡 impending death**

在下一个计划观察期前出现垂死状态或死亡。啮齿动物的临近死亡状态的表现有抽搐、侧卧、斜躺和震颤(细节可见人道处死终点指南文件)。

3.7

经口半数致死量(LD<sub>50</sub>) median lethal oral dose

经口半数致死量是通过统计学推断出来的能够导致经口染毒受试动物一半死亡的一次染毒剂量。LD<sub>50</sub>以单位体重受试动物的染毒剂量(mg/kg)来表示。

3.8

限制剂量 limit dose

受试动物在最高剂量上进行试验(2 000 mg/kg 或 5 000 mg/kg)。

3.9

濒死状态 moribund status

受试动物处于临死状态或即使接受治疗也不能存活的状态(详见人道处死终点指南文件)。

3.10

名义受试动物量 nominal sample size

受试动物的数目,即染毒序列开始时可能出现反应的动物数量减1,或除第一次发生逆转的一对动物以外的受试动物的数量。例如,在一个模型序列:OOOXXOXO中X和O表示相应动物的反应结果(如X表示在48 h内死亡,O表示存活)。此时,受试动物的总数量(或常规意义的试样量)是8,名义受试动物量是6。这个特殊例子显示4只动物发生逆转。但必须注意标准中某一特定部分中的数量是指名义受试动物量还是受试动物总数。例如,最大受试动物数量是15。当以最大受试动物数量终止试验时,名义受试动物量将小于或等于15。名义受试动物量是从第( $r-1$ )个动物开始(出现逆转对的第二只动物前的那一只)(见3.13)。

3.11

可预测的死亡 predictable death

通过临床表现可以预测在试验结束前的某个时间会发生死亡,如:不能饮水或进食(详见人道处死终点指南文件)。

3.12

概率 probit

是“概率积分转换”术语的缩写,当反应曲线是一条直线,斜率为标准偏差( $\sigma$ )的倒数时,可用剂量-反应模型概率来分析预期剂量/反应(以对数尺度为典型)的标准正态分布(此时的正态分布是以平均值为轴心,以 $\sigma$ 为度量尺度)。如果一个致死量的标准正态分布是对称的,意味着LD<sub>50</sub>是真实的或中位响应。

3.13

逆转 reversal

是指一种现象,即在某个染毒剂量下观察动物无反应,在下一个染毒剂量下观察动物有反应,反之亦然(也就是前一个动物发生反应,后一个动物无反应)。因此,一对不同的动物染毒反应情况产生一个逆转。第一对发生逆转的动物编号为 $r-1$ 和 $r$ 。

3.14

标准偏差( $\sigma$ ) standard deviation

是一个正态对数曲线的标准偏差,该曲线描述的是受试动物对化学品染毒的承受范围(如染毒剂量超过受试动物的承受限,受试动物就可能发生反应)。 $\sigma$ 值给出了受试动物对整个染毒剂量区间发生反应的变动性。见斜率和概率。

3.15

斜率(剂量-反应曲线) slope(of the dose-response curve)

是剂量-反应曲线与剂量主轴所形成的角度值。如果以概率作为度量尺度与染毒剂量对数进行概率分析时是正态分布,那么剂量-反应曲线将会是一条直线,且斜率是 $\sigma$ (受试动物染毒承受力的标准偏差)。见概率和 $\sigma$ 。

## 3.16

**停止规则 stopping rule**

本标准中所用的停止规则在以下情况是同义的:1)一个具体的停止规则;2)用来确定什么时候停止试验序列的规则汇集。特别是进行主要试验时,停止规则作为一个快速准则使用,此时比率与临界值的比较结果决定是否停止试验。

**4 试验原则****4.1 限量试验原理**

限量试验是一个连续的实验,动物最大使用量是5只。试验使用的剂量为2 000 mg/kg,或异常情况为5 000 mg/kg。使用2 000 mg/kg和5 000 mg/kg的试验过程有轻微的差别(见5.3.2.1.1和5.3.2.1.2)。当受试物的LD<sub>50</sub>接近限度剂量时,进行连续试验计划可以增加统计的有效性,但可能会向不进行限量试验的情况偏离;即出现方法安全性的问题。正如任何的限量试验,当真实LD<sub>50</sub>非常接近限制剂量时,可能会降低对受试物进行正确的分类。

**4.2 主要试验原理**

4.2.1 主要试验是由一个单级动物染毒剂量系列组成,每个动物每次至少要间隔48 h。按照低于最佳估算LD<sub>50</sub>一级的剂量给第一只动物染毒。如果受试动物存活,便使用高于最初剂量3.2倍的剂量给第二只动物染毒;如果第一只受试动物死亡,第二只动物就要接受较低的剂量,剂量级数同上面相似(3.2是一个默认系数,对应于一个半对数单位的剂量级数,5.3.2.2.2提供了剂量步进系数的选择)。对每只动物都应认真观察至少48 h后,才能决定是否对下一只动物染毒或染毒剂量的多少。该决定取决于观察期满后的动物生存状况(见5.3.2.2.1和5.3.2.2.5中剂量间隔的选择)。为了降低因较差的起始剂量值或低的斜率所造成的影响,调整染毒剂量模式,此时,使用停止原则可以使受试动物数量维持较低水平(见5.3.2.2.4)。当满足这些停止原则时,染毒就要停止(见5.3.2.2.3和6.2.1),这时,基于终止时所有动物的试验情况,就可以对LD<sub>50</sub>和置信区间进行评估。在大多数情况下,动物实验结果中出现第一对逆转后,试验仅仅需要4只动物就可完成。采用最大似然法对LD<sub>50</sub>进行计算(见6.2.1和6.2.3)。

4.2.2 计算的过程以主要试验得到的结果作为起点,给出一个可信的置信区间评估。置信区间CI的介绍(见6.3.1)。

**5 试验方法****5.1 实验动物****5.1.1 动物种类的选择**

5.1.1.1 啮齿类动物中首选大鼠,但也可选用其他啮齿类动物。通常选用雌性大鼠。这是因为有文献报道,传统的LD<sub>50</sub>方法中,性别间的敏感性差别甚小,在观察这种敏感性差别时,通常雌性大鼠稍敏感。但是,在缺乏构效关系或无提示雄性更为敏感性别动物的前提下,一般选用雌性动物进行试验。当用雄性大鼠做试验时,要提供充分的理由。

5.1.1.2 应选用年轻健康动物和非经产、未受孕的雌性动物。在试验开始时,每只动物的年龄应该在8周~12周,动物体重变异不应超过平均体重的±20%。

**5.1.2 饲养条件**

试验动物房的温度应控制在22℃(±3℃)。相对湿度至少保持30%,不超过70%,但是在清扫动物房时除外,最好是50%~60%。应采用人工照明,保持12 h光照和12 h黑暗交替。动物宜单笼饲养,用常规实验室饲料,自由饮水。

**5.1.3 动物准备**

随机选择动物并进行标号确认,染毒前至少提前5 d将动物置于试验笼中饲养,使其适应试验条

件。如果进行连续的试验,要注意确保在整个研究中都能够得到合适体重和年龄的动物。

## 5.2 染毒准备

一般情况下,在染毒范围中受试物应保持恒定的体积,改变其浓度值来进行染毒试验。如果受试物是液体或混合物,例如,在一个恒定浓度时,使用不稀释的受试物很大可能会对后面的风险评估产生影响,这时,就需要调整操作。在任何情况下,都不能超过最大执行染毒体积。液体的每次最大执行染毒体积取决于受试动物的大小。对啮齿类动物而言,体积一般不超过 1 mL/100 g;如果是水溶液,可以考虑使用 2 mL/100 g。建议受试物尽可能溶解在水中,或制成悬浮液或乳状液,其次考虑用油(如玉米油)或可能的其他赋形剂。当选用非水的赋形剂时,应了解所用赋形剂的毒性。受试物应在试验前现用现配,除非知道受试物在赋形剂中的稳定时间。

## 5.3 试验步骤

### 5.3.1 染毒

5.3.1.1 使用胃管或合适的导管对动物进行灌喂染毒。如果非正常情况下未能一次染毒,也可在 24 h 内分较小体积多次染毒。

5.3.1.2 动物在染毒前应禁食(如:大鼠应在染毒前一天开始禁食除水以外的食物。小鼠在染毒前 3 h~4 h 内禁食除水以外的食物)。禁食后对动物称重,然后再进行染毒。根据禁食后的动物体重计算染毒剂量。染毒后的大鼠在 3 h~4 h 后再供应食物,小鼠为 1 h~2 h。当染毒分次进行时,根据染毒时间段的长短来保障动物食物和水的供应。

### 5.3.2 限量试验和主要试验

如果有相关的资料表明受试物可能无毒,可以进行限量试验。受试物的毒性信息识别可以通过相似化合物或相似混合物及产品的测试信息来获得。当受试物的毒性信息很少或没有时,或推测到受试物有毒时,就要进行主要试验。

#### 5.3.2.1 限量试验

##### 5.3.2.1.1 剂量 2 000 mg/kg 限量试验

用上限剂量对动物进行染毒。如果动物出现死亡,进行主要试验并计算  $LD_{50}$ 。如果动物存活,继续对另外 4 只动物进行连续染毒,因此进行试验的动物为 5 只。然而,如果有 3 只动物出现死亡,限量试验就停止,进行主要试验。如果 3 只或 3 只以上动物存活,那么  $LD_{50}$  大于 2 000 mg/kg。如果试验中动物出现意外的延迟死亡,此时要停止染毒并观察所有的动物,看其他动物在相同的观察周期是否也会出现死亡(见 5.3.2.2 中初始观察期)。延迟死亡的动物应同其他死亡的动物一样记入死亡数量。结果评估如下(O=存活,X=死亡)。

——当 3 只或 3 只以上动物出现死亡, $LD_{50}$  低于限量剂量(2 000 mg/kg)。

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

如果第 3 只动物出现死亡,则进行主要试验。

——测试 5 只动物。当 3 只或 3 只以上动物存活,则  $LD_{50}$  大于限量剂量(2 000 mg/kg)。

O OO OO

O OO XO

O OO OX

O OO XX

O XO XO

O XO OO/X

O OX XO

O OX OO/X

O XX OO

#### 5.3.2.1.2 剂量 5 000 mg/kg 限量试验

特殊情况下才使用 5 000 mg/kg 进行限量试验(见附录 C)。出于对动物的人道考虑,不主张对 GHS 第 5 类中(2 000 mg/kg~5 000 mg/kg)的物质进行动物测试,只有当试验结果极可能涉及人类或动物健康以及环境保护等因素时,方考虑进行该试验。

对一只动物用 5 000 mg/kg 剂量进行染毒,如果动物死亡,就进行主要试验来确定  $LD_{50}$ 。如果动物存活,继续对另外两只动物进行染毒。如果两只动物都存活,则  $LD_{50}$  高于限制剂量,限量试验结束(即:持续观察 14 d,不对另外的动物进行染毒)。

如果一只或者两只动物出现死亡,那么再给另外两只动物依次染毒。如果试验中有一只动物出现延迟死亡且其他动物存活,此时应停止染毒并观察所有的动物,看其他动物在相同的观察周期是否也会死亡。延迟死亡的动物应同其他死亡的一样记入死亡数量。结果评估如下(O=存活,X=死亡,U=不必要)。

——当 3 只或更多的动物死亡, $LD_{50}$  低于限量剂量(5 000 mg/kg)。

O XO XX

O OX XX

O XX OX

O XX X

——当 3 只或更多的动物存活, $LD_{50}$  高于限量剂量(5 000 mg/kg)。

O OO

O XO XO

O XO O

O OX XO

O OX O

O XX OO

#### 5.3.2.2 主要试验

5.3.2.2.1 通常每间隔 48 h 对每只动物逐一染毒。然而,染毒间隔时间是由发作、持续和中毒症状的严重性共同决定的。应当确认先前染毒的动物仍然存活后,方可进行下一个剂量的染毒。染毒间隔时间可做适当的调整,例如,在非确定情况下,当连续染毒过程中的染毒间隔是固定时,试验较易进行。如果试验中的染毒间隔时间是变化的,则不必要重新计算染毒剂量和概率比率。为了选择起始剂量,所有可得到的资料,包括与受试物在结构上相关的物质信息以及受试物的所有毒性测试结果,都应用于估测  $LD_{50}$  和剂量-反应曲线的斜率。

5.3.2.2.2 第一只动物的染毒剂量要比  $LD_{50}$  的最佳预测值低一级。如果这只动物存活,便使用较高的剂量给第二只动物染毒。如果第一只动物出现死亡或者濒死的状况,那么就用较低的剂量对第二只动物进行染毒。剂量级数因子应该选择为  $1/(\text{预算的剂量-反应曲线斜率})$  的逆对数,而且在整个测试中应该保持不变(级数 3.2 对应的斜率为 2)。当没有受试物的斜率信息时,使用的剂量级数因子为 3.2。使用默认的级数因子,染毒剂量依次为 1.75 mg/kg, 5.5 mg/kg, 17.5 mg/kg, 55 mg/kg, 175 mg/kg, 550 mg/kg, 2 000 mg/kg(或者特殊情况使用 1.75 mg/kg, 5.5 mg/kg, 17.5 mg/kg, 55 mg/kg, 175 mg/kg, 550 mg/kg, 1 750 mg/kg, 5 000 mg/kg 的序列进行试验)。如果预测不到受试物的致死量信息,染毒剂量应当从 175 mg/kg 开始。大多数的情况下,这个剂量是亚致死量,因此,采用此剂量可以减少动物的疼痛和受苦程度。如果动物对化学品的忍受剂量远高于预期(即预期斜率低于 2.0),在开始测试前应考虑在剂量对数值上增加 0.5(即 3.2 级数因子)。同样的,对于已知斜率很陡的受试物,应选取比默认值小的剂量级数因子。(附录 A 包含了一个剂量级数表,起始剂量为 175 mg/kg,



斜率范围在 1~8 之间)。

5.3.2.2.3 是否继续进行染毒,取决于固定时间间隔后(如 48 h)所有动物的试验结果。当符合以下其中一个停止规则时,试验可以结束:

- a) 在上限剂量时有连续 3 只动物存活;
- b) 在连续测试的任意 6 只动物中有 5 个逆转现象发生;
- c) 至少有 4 只动物跟随第一个逆转现象,并且确定的概率比率超过临界值(见 6.2.4 和附录 B。

在试验进行到第一个逆转现象后的第 4 只动物时,要对每一次染毒剂量进行计算)。

对于  $LD_{50}$  和斜率变化很大的化合物,试验出现逆转后再进行 4 到 6 只动物即可满足停止规则 c)。在一些情况下,对于剂量-反应曲线斜率较小的化学物质,可能需要更多的动物(最高试验动物总数为 15)。

5.3.2.2.4 当符合停止规则时,根据 6.1 和 6.2.1 的试验结果计算  $LD_{50}$ 。

5.3.2.2.5 出于人道而处死的动物应等同考虑。如果试验中一只动物发生延迟死亡,并且其他服用同等或更多剂量的动物仍存活,比较合适的做法是停止染毒,并观察所有动物,看其他动物是否会在相似的观察期内死亡。如果后来存活的动物同样死亡,则表明所有剂量水平都超过了  $LD_{50}$ ,这时最恰当的做法是重新开始试验,所用起始剂量至少低于最低的死亡剂量的两级(并延长观察时间),因为当起始剂量低于  $LD_{50}$  时,方法是最准确的。如果服用与之前死亡的动物同等或更多剂量的动物能够存活,就不需要改变剂量级数,因为死亡动物的信息将会作为比存活动物更低剂量的死亡率包含到计算中去,而不是后来的存活动物里,这会使  $LD_{50}$  降低。

## 5.4 观察

5.4.1 在染毒后的前 30 min 内,至少每个动物观察一次,前 24 h 内要定时观察(在前 4 h 内要特别注意),之后每天观察一次,共观察 14 d,除非因人道需要处死或发现死亡。然而,观察时间间隔不应硬性规定。它要视中毒反应、发作时间以及恢复周期的长短而决定,如有必要可加以延长。中毒征兆出现和消失的时间是很重要的,尤其是有中毒征兆延迟趋势的时候。系统的登记所有的观察资料与动物个体的记录。

5.4.2 如果动物继续出现中毒征兆,则必须进行额外的观察。观察应该包括皮肤和毛皮、眼睛和黏膜、呼吸、循环、自主神经和中枢神经系统、肢体活动和行为模式的改变。应重点放在震颤、抽筋、流涎、腹泻、嗜睡、睡眠和昏迷的观察上(应考虑人道处死终点指南文件中概述的原则和标准)。发现处于濒死状态动物以及动物表现出剧烈的疼痛或持续严重痛苦的病症时给予人道处死。当动物被人道处死或者被发现死亡时,应尽可能精确地记录死亡的时间。

### 5.4.3 体重

应在受试物进行染毒前不久测量动物的个体体重,此后应至少每周一次。计算和记录体重的变化。在试验结束时存活动物应称量体重后再进行人道处死。

### 5.4.4 病理学

所有的动物(包括在试验期死亡及因人道处死而移出试验室的)应该进行大体解剖。记录每个动物的全体病理的变化。在初次剂量染毒后存活 24 h 或以上的动物可以考虑对其存在大体病理的器官组织进行微观检查,因为它可能会产生有用的信息。

## 6 数据和报告

### 6.1 数据

需要提供个体动物的数据。此外,还要求所有数据以列表形式汇总,列表包括在每个染毒剂量试验所用的动物数量、出现毒性症状的动物总数,试验过程中死亡的动物数量或人道处死的动物数量,个体动物的死亡时间,以及毒性表现的时间过程及其逆反表现描述,尸检结果。同时提供支持选择起始剂量

和剂量级数的基本理由和所有支持数据。

## 6.2 主要试验中 LD<sub>50</sub> 的计算

6.2.1 除了 6.2.2 描述的特殊情况以外,最大似然法对 LD<sub>50</sub> 的进行计算。下列统计学详细资料可能对应用最大似然法计算有所帮助(假设一个  $\sigma$ )。无论是直接死亡、延迟死亡或人道处死,都包含在最大似然法分析的目标函数中。似然函数见式(1)。

$$L = L_1 L_2 \cdots L_n \quad \text{.....(1)}$$

如果第  $i$  个动物存活,  $L_i = 1 - F(Z_i)$  或 .....(2)

如果第  $i$  个动物死亡,  $L_i = F(Z_i)$  .....(3)

式中:

$L$ ——试验结果的似然值;

$n$ ——试验动物的总数;

$F$ ——标准累积正态分布;

$Z_i$ —— $[\log(d_i) - \mu]/\sigma$ ;

$d_i$ ——第  $i$  个动物的染毒剂量。

$\mu$  和  $\sigma$  为给定,  $\sigma$  为标准偏差。

真实 LD<sub>50</sub> 的估算值由似然值  $L$  取最大值时的  $\mu$  计算得到(见 6.2.3)。

$\sigma$  的估计值一般为 0.5,除非能够得到一个较好的一般性或特殊情况的数据。

6.2.2 在某些情况下,不能进行统计计算或有可能得出错误结果。出现以下情况时可以通过特殊方法确定 LD<sub>50</sub> 的估算值:

- 如果试验基于 5.3.2.2.3 中的 a)(即重复进行上限剂量试验)停止,或者因上限剂量停止试验, LD<sub>50</sub> 则高于上限值。分类也在此基础上完成。
- 如果所有死亡动物的染毒剂量比所有存活动物高(或者所有存活动物的染毒剂量比所有死亡动物的高,虽然这几乎是不可能的),则 LD<sub>50</sub> 介于存活动物染毒剂量和死亡动物染毒剂量之间。这些观察结果不能进一步给出准确 LD<sub>50</sub> 的信息。尽管如此,假设给定  $\sigma$  值,则可以计算出最大似然 LD<sub>50</sub>。5.3.2.2.3 的 b)对这种情况进行了描述。
- 如果存活和死亡的动物使用的染毒剂量是相同的,并且其他死亡动物都使用更高的染毒剂量而其他存活动物都使用更低的染毒剂量,或者出现相反的情况,则 LD<sub>50</sub> 等于相同的那个染毒剂量。如果受试物是一个与之非常接近的相关物质,应该使用一个较小染毒剂量级数进行试验。

如果上述情况都不出现,则 LD<sub>50</sub> 应用最大似然法进行计算。

6.2.3 最大似然计算可以采用 SAS(如非线性回归分析统计程序 PROC NLIN)或统计软件 BMDP(如 AR 程序)的计算程序包(这些计算程序包在参考文献[1]的附录 1D 中有描述)。或使用其他的计算软件。ASTM E 1163—1987 的附录对这些程序作了特殊说明(BASIC 程序使用的  $\sigma$  值需要进行校正)。程序得到的结果是  $\log$  LD<sub>50</sub> 估算值及其标准误差。

6.2.4 5.3.2.2.3 中的 c)是基于试验程序的三次试验,以表格的形式列出不同  $\mu$  值时 6.2.1 的似然性结果。当第 6 只动物已经不能满足 5.3.2.2.3 中 a)或 b)时,对之后的每个动物试验进行对比。标准似然性比率方程列于附录 B 中。这些对比以自动化方式利用电子数据表软件很容易完成并可以重复进行,如附录 B 中提到计算机软件。如果符合标准规则,试验停止,可用最大似然性方法即可计算出 LD<sub>50</sub>。

## 6.3 置信区间的估计

6.3.1 根据主要试验和 LD<sub>50</sub> 估计值的计算,可以得出 LD<sub>50</sub> 的置信区间。任何一个置信区间在主要试验的可靠性和实用性方面都提供了有价值的信息。一个宽的置信区间表明 LD<sub>50</sub> 估计值有较多的不确定性。LD<sub>50</sub> 估计值的可靠性低时,其有效性也就低。一个窄的置信区间表明预期 LD<sub>50</sub> 有较小的不确定性。LD<sub>50</sub> 估计值可靠性高,其有效性也就高。这就意味着,如果重复进行主要试验,那么新的 LD<sub>50</sub> 估计值应与原来的 LD<sub>50</sub> 估计值接近,并且这两种 LD<sub>50</sub> 估计值应接近真实 LD<sub>50</sub>。

6.3.2 根据主要试验结果,计算出真实 LD<sub>50</sub> 的两个不同类型置信区间中的其中一个。

——当至少试验三种染毒剂量,且中间剂量染毒时至少有一个动物存活和一个动物死亡,此时,可以用一个似然性的计算机程序得到一个置信区间,即真实  $LD_{50}$  的 95% 置信区间。然而,由于希望使用少量的动物进行试验,实际可信度水平一般不准确。使用随机停止规则改善了应对条件发生变化的能力,但同时会导致报道的置信水平与真实置信水平存在稍许差别。

——如果所有的动物在或低于某一染毒剂量水平时存活,且所有的动物在下一个较高染毒剂量时死亡,则可以计算出一个区间,下限为所有动物存活时的最高染毒剂量,上限为所有动物死亡时的染毒剂量。这个区间标注为“大约”,即这个区间的准确置信水平不能明确确定。然而,由于这种类型的反应仅发生在剂量反应不合理的时候,在大多数情况下,真实  $LD_{50}$  位于计算的置信区间内或非常接近。这个区间可能相对较窄,且在大多数的实际使用中十分准确。

6.3.3 在某些情况下,置信区间报道为无穷大,此时以零作为它的下限,无穷大作为它的上限,或两者兼而有之。例如,此类置信区间可能发生在所有动物死亡或所有动物存活的时候。实施这个固定的程序需要专门的计算方法,可使用 USEPA 或者 OECD 中的一个专门程序,或者使用 USEPA 或 OECD 中技术性细节资料。资料中描述的这些置信区间的覆盖情况和专用程序的性能,同样也可以通过 USEPA 获得。

#### 6.4 试验报告

报告的内容必须包括以下的信息:

##### 6.4.1 受试物

6.4.1.1 物理性质,纯度,相关的物理化学性质(包括异构体);

6.4.1.2 标识资料,包括 CAS 号。

##### 6.4.2 赋形剂

如果赋形剂不是水,注明赋形剂的选择理由。

##### 6.4.3 试验动物

6.4.3.1 使用的动物品/系;

6.4.3.2 动物的微生物状况(已知);

6.4.3.3 动物数量,年龄和性别(如需要,包括使用雄性代替雌性的理由);

6.4.3.4 水源、饲养条件、饲料等。

##### 6.4.4 试验条件

6.4.4.1 最初剂量的选择的基本原理,染毒剂量级数因子以及接下来的染毒剂量水平;

6.4.4.2 受试物化学式详细资料,包括物质用来染毒时的物理形态的详细资料;

6.4.4.3 受试物执行染毒时的详细资料,包括染毒体积和染毒时间;

6.4.4.4 饲料和水质的详细资料(包括饲料类型、饲料来源和水源)。

##### 6.4.5 结果

6.4.5.1 体重及体重的改变;

6.4.5.2 以表格的形式列出每只动物的响应数据和剂量水平(如:动物出现的毒性症状包括性质、严重程度、影响的持续性和死亡率);

6.4.5.3 染毒时的动物个体体重,随后,以周为间隔称重时的体重,以及死亡时的体重;

6.4.5.4 每只动物出现毒性症状的时间进程,且是否可逆的;

6.4.5.5 每只动物的尸检结果和组织病理学结果(如果有);

6.4.5.6 半数致死量数据;

6.4.5.7 统计学处理的结果(使用的计算机程序描述和电子数据表格的计算)。

##### 6.4.6 结果的讨论和分析

##### 6.4.7 结论

附 录 A  
(规范性附录)  
染 毒 过 程

### A.1 主要试验的染毒剂量序列

A.1.1 上下增减剂量法:给动物逐只染毒,通常间隔 48 h。第一只动物接受的剂量在最佳估计半数致死量水平的下一个级数。这个选择反映了一个调整趋势,偏向远离 LD<sub>50</sub> 的初始剂量方向,在最后估算开始剂量。为之后的每只动物调整剂量,希望全部试验的结果稳定。以下内容为剂量范围提供了更多的选择。

A.1.2 默认剂量级数:一旦确定了开始剂量和剂量间隔,毒物学家就应该列出所有可能的剂量包括上限(通常是 2 000 mg/kg 或 5 000 mg/kg)。剂量接近上限就应该与级数不同。阶梯性的本标准设计规定开始数次剂量作为一种自我调节次序的功能。由于正偏值,对物质毫无所知的情况下,建议初始剂量为 175 mg/kg。如果默认次序在主要测试中使用,应该从 175 mg/kg 开始和剂量间隔为一个剂量级数因素按对数计算的默认值 0.5。剂量的使用应包含 1.75 mg/kg,5.5 mg/kg,17.5 mg/kg,55 mg/kg,175 mg/kg,550 mg/kg,2 000 mg/kg 或有特殊需要时 1.75 mg/kg,5.5 mg/kg,17.5 mg/kg,55 mg/kg,175 mg/kg,550 mg/kg,1 750 mg/kg,5 000 mg/kg。对于毒性高的物质,定量染毒序列要向低值延伸。

A.1.3 表 A.1 提供了剂量级数为整数倍数的斜率(1~8),此时的剂量级数因子不是默认值。

表 A.1 剂量序列

单位为毫克每千克

斜率=	1	2	3	4	5	6	7	8
	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>	0.175 <sup>a</sup>
					0.275	0.26	0.24	0.23
				0.31			0.34	0.31
			0.375			0.375		0.41
					0.44		0.47	
		0.55		0.55		0.55		0.55
					0.69		0.65	
								0.73
			0.81			0.82		
				0.99			0.91	0.97
					1.09	1.2		
							1.26	1.29
	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
							2.4	2.3
					2.75	2.6		
				3.1			3.4	3.1
			3.75			3.75		
					4.4			4.1
							4.7	
		5.5		5.5		5.5		5.5

表 A.1 (续)

单位为毫克每千克

斜率=	1	2	3	4	5	6	7	8
					6.9		6.5	
								7.3
			8.1			8.2		
				9.9			9.1	9.7
					1.09	12		
							12.6	12.9
17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
							24	23
					27.5	26		
				31			34	31
			37.5			37.5		
					44			41
							47	
		55		55		55		55
							65	
					69			73
			81			82		
				99			91	97
					109	120		
							126	129
175	175	175	175	175	175	175	175	175
							240	230
					275	260		
				310			340	310
			375			375		
					440			410
							470	
		550		550		550		550
							650	
					690			730
			810			820		
				990			910	970
					1 090	1 200		
							1 260	1 290
1 750	1 750	1 750	1 750	1 750	1 750	1 750	1 750	1 750
							2 400	2 300
					2 750	2 600		
				3 100				3 100
						3 750	3 400	
								4 100
5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000	5 000

<sup>a</sup> 如果需要较低的剂量,将序列延续至较低的剂量。

## 附录 B

## (资料性附录)

## 似然比停止规则的估算

**B.1** 主要试验可能以三个停止规则(见 5.3.2.2.2)的第一个为基础完成。无论如何,尽管没有一个停止规则让人满意,但是当染毒动物数量达到 15 个时也要停止染毒。表 B.1~表 B.4 中列举出没有任何受试物信息的例子,因此推荐使用默认起始剂量 175 mg/kg,默认剂量阶数因子为 3.2 或一个半对数。请注意列出这些表格仅是作为例证。

**B.2** 表 B.1 显示在极限剂量 2 000 mg/kg 下如果 3 个动物存活,主要试验将如何停止。表 B.2 显示了在极限剂量为 5 000 mg/kg 下的类似情形(这些都是限量试验不适合的情况)。表 B.3 举出了一个特殊的序列,其中 6 个试验动物中出现了 5 个逆转,然后结束试验。最后,表 B.4 举例说明这样一个情况:当试验结果既不满足停止规则 a)也不满足停止规则 b)时,连续 4 个受试动物出现了逆转反应,因此,接下来应评估停止规则 c)。

**B.3** 停止规则 c)需要在每个动物测试后用似然比停止规则对其进行评估,从出现逆转后的第四个动物开始。推测出三个“试验程序方法”。技术上来说,这些程序方法是可能的,如推荐的 LD<sub>50</sub> 的最大似然评估方法。这个程序接近于以概率为基础的置信区间的计算。

**B.4** 程序的基础是:当已经收集到了足够的数据时,LD<sub>50</sub> 点评估将比上下增减剂量法评估更受支持,此时利用概率对统计进行量化。因此要计算三个概率值:一个 LD<sub>50</sub> 点评估概率(例子中称为粗评估或剂量均值评估),一个低于点评估的数值的概率,一个高于点评估的数值的概率。特殊情况下,低数值除 2.5 后被当作点评估,高数值乘 2.5 后被当作点评估。

**B.5** 通过似然性比率的计算来比较似然值,然后判断这些似然性比率(LR)是否超过一个临界值。当点评估的似然性比率超过其他每个似然性 2.5 步进因子时,停止试验,该因子可表示点评估相对强的统计支持。因此计算两个似然比率,一个是点评估与除 2.5 后评估比率,一个是点评估与乘 2.5 后评估比率。

**B.6** 单独的 LD<sub>50</sub> 值的计算用带正态概率函数功能的任何电子制表软件很容易完成。附录 B 中表 B.4 所举的 LD<sub>50</sub> 值例子就是模仿电子制表软件构建出来的。表中以极限剂量上限 5 000 mg/kg 为例介绍了计算步骤,上限剂量为 2 000 mg/kg 时计算步骤相同。同时,功能全面的软件可以从 OECD 和 US EPA 网址上直接下载,软件可提供动物数据所需的登记表格,LD<sub>50</sub> 评估必须的公式,以及置信区间的计算。表 B.5 给出了这个软件的屏幕图像。

**B.7** 上限剂量为 5 000 mg/kg 的虚拟范例(见表 B.4)

在这个虚拟例子中,上限剂量为 5 000 mg/kg,在试验完 9 个动物后满足了似然比停止规则。第 3 个动物试验时出现了第一次“逆转”。当试验完“逆转”后的 4 个动物时要检查似然比停止规则是否满足。在这个例子中,逆转后的第 4 个动物即为实际试验中的第 7 个动物。因此,对于这个例子来说,电子制表软件的计算仅需要从第 7 个动物进行试验后开始,同时进行数据输入。随后,在第 7 个动物、第 8 个动物和第 9 个动物试验后也要进行似然比停止规则的查看。此例中,在第 9 个动物试验完后首次满足了似然比停止规则。

——依次输入每只动物的剂量-反应信息。

第 1 栏 步骤编号为 1~15。试验动物最多为 15 只。

第 2 栏 每一个接受试验的动物在该栏标记为 I。

第 3 栏 输入第 *i* 个动物的染毒剂量。

第 4 栏 注明动物反应状况:有反应(标记为 X),无反应(标记为 O)。

——名义和实际受试动物量

名义受试动物数量由第一次逆转的两只动物(这里是第2只和第3只动物)加上后来接受试验的所有动物组成。第5栏列出了每只动物是否记入名义受试动物数量中。

第16行给出了名义受试动物数量( $n$ )。这是名义受试动物的数量。在这个例子里, $n$ 为8。

第17行为实际受试动物的数量。

——LD<sub>50</sub>的粗评估

记入名义受试动物数量中的动物,其染毒剂量几何平均值用于对LD<sub>50</sub>进行粗评估。在表中,称之为“平均剂量估计量”。它随着每只接受试验的动物而更新。为了允许选择一个较差的初始测试剂量,该平均值要限于名义动物数量中,它可以产生一个初始的反应群和一个初始的非反应群。(但是,下面最终LD<sub>50</sub>的似然性计算中用到的是所有的动物数量)。回忆一下, $n$ 个数量的几何平均数是 $n$ 个数量的 $1/n$ 次方的产物。

第18行为平均剂量估计值[例如, $(175 \times 550 \times \dots \times 1750)^{1/8} = 1\,292.78$ ]。

第19行为第18行值的对数(10为底)(例如: $\log_{10} 1\,292.8 = 3.112$ )。

——粗LD<sub>50</sub>估计值似然性

似然性是一个统计学方法,用来量度数据对LD<sub>50</sub>或其他参数的估计值的支持程度。似然性比率值可用于比较数据对于不同的LD<sub>50</sub>估计值的满意支持程度。

第8栏按LD<sub>50</sub>的粗评估计算LD<sub>50</sub>平均估计值的似然性。该似然性(第21行)是分布到各只动物上的似然性的总和(见6.2.1)。每只动物上的似然性分布用 $L_i$ 表示。

在第7栏中输入各反应剂量 $d_i$ 的概率估计值,记作 $P_i$ 。 $P_i$ 从剂量-反应曲线计算得出(注意:一个概率单位剂量-反应曲线的参数是斜率和LD<sub>50</sub>,所以需要这些参数的数值)。第18行的剂量-均值估计值用于LD<sub>50</sub>的估算。这个例子中的斜率使用默认值2。利用下面列出的步骤计算反应概率 $P_i$ 。

a) 计算 $\lg d_i$ (第6栏)。

b) 计算每个动物的 $z$ -score,记作 $Z_i$ (不列入表中),用公式

$\sigma = 1/\text{斜率}$ ,

$$Z_i = \lg d_i - \lg \text{LD}_{50} / \sigma$$

例如:第一只动物(第一栏),

$$\sigma = 1/2$$

$$Z_1 = (2.243 - 3.112) / 0.500 = -1.738$$

c) 第 $i$ 个剂量的估计反应概率为

$$P_i = F(Z_i)$$

这里, $F$ 表示标准正态分布的累积分布函数(即:均值为0,变异系数为1的正态分布)。

例如(第一行):

$$P_1 = F(-1.738) = 0.0412$$

统计表中的函数 $F$ (或相似函数)用于正态分布,但是该函数做为电子制表软件函数也同样得到广泛的应用。可看到该函数有不同的名字,如Lotus1-2-3正态函数和Excel中的@NORMDIST函数。为确保你已经正确使用了软件中的函数,你可以用常见的值进行检验,如 $F(1.96) \approx 0.975$ 或 $F(1.64) \approx 0.95$ 。

第8栏:计算了似然性分布的自然对数 $\ln L_i$ 。 $L_i$ 仅仅是实际观察到的每只动物的反应的概率:

有反应动物:

$$\ln L_i = \ln P_i$$

无反应动物:

$$\ln L_i = \ln (1 - P_i)$$

注意这里用的是自然对数( $\ln$ ),而其他地方(通常)用的是以10为底的对数。这些选择通常是由上下文来预测的。

每只动物都要完成上述步骤。最后:

第20行:第8栏对数-似然性分布求和。

第21行:对第20行的可能性贡献的 $\log$ 值进行 $\exp$ 函数计算。(如: $\exp(-3.389) = e^{-3.389} = 0.0337$ )。

——计算 LD<sub>50</sub> 的粗估计值的上下两种剂量的似然性

如果可以精确估计数据,对偏离估计值 LD<sub>50</sub> 较远的值的似然性而言,合理的 LD<sub>50</sub> 估计值将会有高的似然性。比较剂量-均值评估的似然性(1 292.8,第 18 行)和以 2.5 阶数因子发生变化的值(即到 1 292.8×2.5 和 1 292.8/2.5)。计算同上面描述的类似(列于第 9~12 栏中),除了 517.1(=1 292.8/2.5)和 3 232.0(=1 292.8×2.5)替代 1 292.8 用于 LD<sub>50</sub> 的估计。

——计算似然性比率

用三个似然值(第 21 行)来计算两个似然比(第 22 行)。似然比是用于比较统计学对估计值 1 292.8 的支持和对其他每个估计值的支持,其它估计值指的是 517.1 和 3 232.0。两个似然比计算如下:

$$LR1 = [1\ 292.8 \text{ 的似然值}] / [517.1 \text{ 的似然值}]$$

$$= 0.033\ 7 / 0.008\ 0$$

$$= 4.21$$

$$LR2 = [1\ 292.8 \text{ 的似然值}] / [3\ 232.0 \text{ 的似然值}]$$

$$= 0.033\ 7 / 0.009\ 8$$

$$= 3.44$$

——确定似然比是否超过临界值

高似然比意味着对 LD<sub>50</sub> 估计值的高支持率。上述两个似然比计算结果(4.21 和 3.44)都超出临界似然比,即 2.5。因此满足了似然比停止规则,试验停止。这种情况在 24 行以 TRUE 来表示,在这个例子中的电子数据表头注释了满足似然比规则。

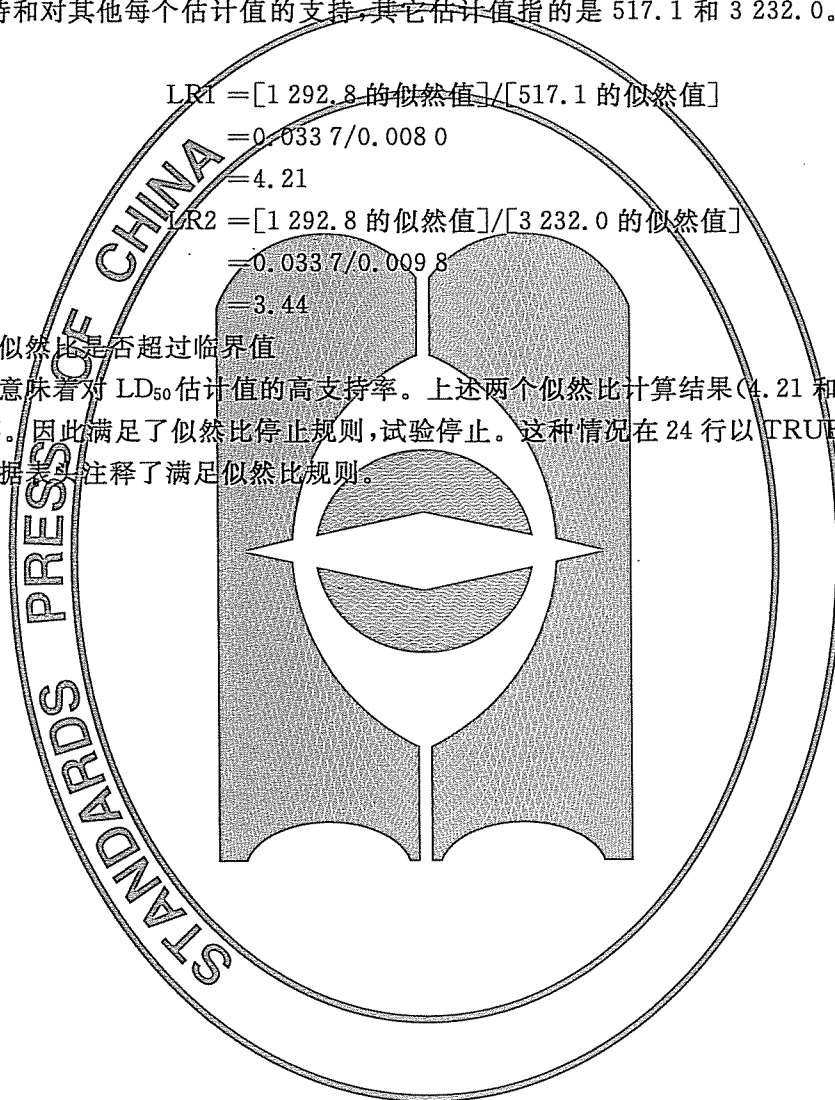




表 B.1 剂量为 2 000 mg/kg 时, 停止规则 a) 范例

因为为3个动物在2 000 mg/kg限量存活 (3 <sup>#</sup> ~5 <sup>#</sup> ), 5 <sup>#</sup> 动物后停止试验																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
级数	(1) 包含 (E) 不包含	剂量	(X) 反应 (O) 没反应	是否属于 名义动物数量	剂量的 常用对数值	LD <sub>50</sub> =		LD <sub>50</sub> =		反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )						
						反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )								
1	I	175	O	否	2. 243 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
2	I	550	O	否	2. 740 4	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
3	I	2 000	O	否	3. 301 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
4	I	2 000	O	否	3. 301 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
5	I	2 000	O	否	3. 301 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!						
6	E				—	—	—	—	—	—	—						
7	E				—	—	—	—	—	—	—						
8	E				—	—	—	—	—	—	—						
9	E				—	—	—	—	—	—	—						
10	E				—	—	—	—	—	—	—						
11	E				—	—	—	—	—	—	—						
12	E				—	—	—	—	—	—	—						
13	E				—	—	—	—	—	—	—						
14	E				—	—	—	—	—	—	—						
15	E				—	—	—	—	—	—	—						
名义受试动物量 =				0													
实际受试动物量 =				5													
计算的LD <sub>50</sub> 的最大似然估计值=无																	

因为 有 3 个动物在 2 000 mg/kg 限量存活 (3<sup>#</sup>~5<sup>#</sup>), 5<sup>#</sup> 动物后停止试验

忽略所有计算单位。反应趋势没有出现逆转

不能进行最大似然性的计算。LD<sub>50</sub> 大于 2 000 mg/kg

表 B.2 剂量为 5 000 mg/kg 时停止规则 a) 范例

级数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	(1) 包含 (E) 不包含	剂量		是否属于 名义动物 数量	剂量的 常用对数值	LD <sub>50</sub> =		LD <sub>50</sub> =		LD <sub>50</sub> =		LD <sub>50</sub> =	
		反应	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应 概率	似然性 分配 (ln L <sub>i</sub> )
1	1	OK	—	否	2.243 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
2	1	0	175	否	2.740 4	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
3	1	0	550	否	3.243 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
4	1	0	1 750	否	3.699 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
5	1	0	5 000	否	3.699 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
6	1	0	5 000	否	3.699 0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
7	E	0	5 000	否	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
13	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
15	E	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

名义受试动物量 =  
实际受试动物量 =  
计算的 LD<sub>50</sub> 的最大似然估计值 = 无

因为 有 3 个动物在 5 000 mg/kg 剂量下停止试验。

忽略所有计算单位。没有逆转现象

不能进行最大似然性的计算。LD<sub>50</sub> 大于 5 000 mg/kg

表 B.3 停止规则 b) 范例

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
级数	(I)包含 (E)不包含	剂量	(X)反应 (O)不反应	是否属于名 义动物数	剂量的 常用对数值	LD <sub>50</sub> = 反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )	LD <sub>50</sub> = 反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )	LD <sub>50</sub> = 反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )
1	I	175	X	否	2.243 0	0.933 5	-0.068 8	0.989 2	-0.010 8	0.760 2	-0.274 2
2	I	55	X	是	1.740 4	0.690 5	-0.370 3	0.902 0	-0.103 1	0.382 6	-0.960 7
3	I	17.5	O	是	1.243 0	0.309 5	-0.370 3	0.617 4	-0.960 7	0.098 0	-0.103 1
4	I	55	X	是	1.740 4	0.690 5	-0.370 3	0.902 0	-0.103 1	0.382 6	-0.960 7
5	I	17.5	O	是	1.243 0	0.309 5	-0.370 3	0.617 4	-0.960 7	0.098 0	-0.103 1
6	I	55	X	是	1.740 4	0.690 5	-0.370 3	0.902 0	-0.103 1	0.382 6	-0.960 7
7	I	17.5	O	是	1.243 0	0.309 5	-0.370 3	0.617 4	-0.960 7	0.098 0	-0.103 1
8	E				—	—	—	—	—	—	—
9	E				—	—	—	—	—	—	—
10	E				—	—	—	—	—	—	—
11	E				—	—	—	—	—	—	—
12	E				—	—	—	—	—	—	—
13	E				—	—	—	—	—	—	—
14	E				—	—	—	—	—	—	—
15	E				—	—	—	—	—	—	—
名义受试动物量 = 6											
实际受试动物量 = 7											
剂量平均估计值 = 31.02											
log10 = 1.492											
似然对数值总和:											
似然值:											
似然比:											
单个似然比是否超出临界值?											
两个似然比是否超出临界值?											
计算 LD <sub>50</sub> 的最大似然估计值 = 29.6											
假设定斜率 = 2   Sigma = 0.5											
在9#动物时,首次满足LR规则,停止试验。 从动物6#开始核查LR规则。											
结论:满足LR规则											
收敛性判别标准参数											
LR临界值											
LD <sub>50</sub> 数因子											
2.5											
自动计算:与此没有联系。											
最终的估计值从最大似然算法获得。											
TRUE											

表 B.4 停止规则 c) 的范例

假定斜率		2	标准偏差		0.5		收敛性判别标准参数											
结论:满足似然比规则							似然比临界值						LD <sub>50</sub> 级数因子		2.5		2.5	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							
级数	(D)包含 (E)不包含	剂量	(X)反应 (O)不反应	是否属于 名义动物量	剂量的常 用对数值	DAE 的 贡献值	LD <sub>50</sub> =		似然值分配		LD <sub>50</sub> =		似然值分配					
							反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )	反应概率	似然值分配 (ln L <sub>i</sub> )						
1	I	175	O	否	2.243 0	0.000 0	0.041 2	-0.042 1	0.173 3	-0.190 3	0.005 7	-0.005 7						
2	I	550	O	是	2.740 4	2.740 4	0.228 9	-0.260 0	0.521 4	-0.736 8	0.062 0	-0.064 0						
3	I	1750	X	是	3.243 0	3.243 0	0.603 7	-0.504 6	0.855 2	-0.156 4	0.297 1	-1.213 8						
4	I	550	O	是	2.740 4	2.740 4	0.228 9	-0.260 0	0.521 4	-0.736 8	0.062 0	-0.064 0						
5	I	1750	X	是	3.243 0	3.243 0	0.603 7	-0.504 6	0.855 2	-0.156 4	0.297 1	-1.213 8						
6	I	550	O	是	2.740 4	2.740 4	0.228 9	-0.260 0	0.521 4	-0.736 8	0.062 0	-0.064 0						
7	I	1750	O	是	3.243 0	3.243 0	0.603 7	-0.925 7	0.855 2	-1.932 3	0.297 1	-0.352 5						
8	I	5000	X	是	3.699 0	3.699 0	0.880 0	-0.127 9	0.975 6	-0.024 7	0.647 7	-0.434 4						
9	I	1750	X	是	3.243 0	3.243 0	0.603 7	-0.504 6	0.855 2	-0.156 4	0.297 1	-1.213 8						
10	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
11	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
12	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
13	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
14	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
15	E				—	0.000 0	—	—	—	—	—	—						
名义受试动物量=				8														
实际受试动物量=				9														
剂量平均估计值				1 292.78														
ln d <sub>i</sub>				3.112														
似然值对数总和:													-4.626 0					
似然值:													0.009 8					
似然比:													3.443 6					
单个似然比是否超出临界值?				临界值=2.5									TRUE					
两个似然比是否超出临界值?													TRUE					

表 B.5 计算机软件执行停止规则 c) 的范例

**AOT425StatPgm** [New Test] [Load Data] [Save Data] [Get Report] [Options] [About AOT425] [Exit]

**Test / Substance:** Example of stopping criterion in Paragraph 33 (c) of OECD TG 425

**Test Type:** Main

**Limit Dose:** 5000

**Assumed values at start of the main test:**  
**LD50:** Default **Sigma:** 0.5

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	1	175	0	0	
2	2	550	0	0	
3	3	1750	X	X	
4	4	550	0	0	
5	5	1750	X	X	
6	6	550	0	0	
7	7	1750	0	0	
8	8	5000	X	X	
9	9	1750	X	X	
10		Stop Dosing			
11					
12					
13					
14					
15					

The main test is complete.

Stopping criteria met: LR criterion.  
 Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.

附 录 C  
(规范性附录)

试剂剂量在 2 000 mg/kg 的分类说明

C.1 对于 LD<sub>50</sub> 大于 2 000 mg/kg 无需试验的受试物的分类标准

C.1.1 GHS 分类急性毒性危险类别为 5 的物质具有相对较低的急性毒性,在某些特定的情况下可能对某些比较脆弱的人群带来危险。这类物质经口或经皮 LD<sub>50</sub> 预计在 2 000 mg/kg~5 000 mg/kg。或其他染毒途径获得的类似结果。

C.1.2 在下列情况下,受试物可以划为 2 000 mg/kg<LD<sub>50</sub><5 000 mg/kg(具有急性毒性,危险类别为 5):

C.1.2.1 有确定的证据表明受试物的 LD<sub>50</sub> 在第 5 类范围内;或其他动物试验以及人类毒性反应表明该物质对人体健康具有急性毒性。

C.1.2.2 具有下列任意一种情况,且通过对数据的外推、预测或衡量不能将该物质划分到更为严重的毒性物质:

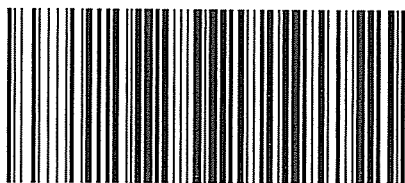
- 有可靠资料表明该物质对人类具有严重的毒性效应;
- 在急性毒性类别 4 的经口毒性试验中具有致死性;
- 在按照急性毒性类别 4 试验时,专家判断出现了较为严重的毒性反应,除了腹泻,毛发竖立或不太明显的症状;
- 通过专家对其他动物试验的判断认为有足够的证据表明该物质有比较明显的潜在急性毒性。

C.2 试验剂量大于 2 000 mg/kg

如果无明确的资料可以证明进行此类试验对人类、动物健康和环境保护有重大意义,出于保护动物的需要,不建议进行第 5 类范围内的动物试验。

参 考 文 献

- [1] Dixon W. J. (1991). Staircase Bioassay: The Up-and-Down Method. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 15, 47-50.
- 



GB/T 21826-2008

版权专有 侵权必究

\*

书号: 155066 · 1-32681

定价: 20.00 元