

中华人民共和国国家标准

GB/T 21800—2008

化学品 生物富集 流水式鱼类试验

Chemicals—Bioconcentration—Flow-through fish test



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

化学品 生物富集 前言

本标准等同采用经济合作与发展组织(OECD)化学品测试导则 No. 305(1996 年),《生物富集:流水式鱼类试验》(英文版)。

本标准做了下列编辑性修改:

——将计量单位改为我国法定计量单位。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E 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:环境保护部化学品登记中心。

本标准参加起草单位:上海市检测中心、上海市环境科学研究院、环境保护部南京环境科学研究所。

本标准主要起草人:于相毅、毛岩、卢玲、赵华清、殷浩文、沈根祥、孔德洋。

生物富集 bioconcentration

试验生物体(或特定组织)内某种受试物质的浓度相对于试验介质中该物质浓度的增加。

生物富集系数 bioconcentration factor, BCF

试验结束前或任何时间,试验生物体(或特定组织)内某种受试物质浓度与试验介质中该物质浓度的比。BCF 也可由动力学参数计算得出,记为 BCF_k。

稳态态 plateau or steady-state

受试物在生物体浓度对时间所绘的曲线与时间轴趋于平行(变化幅率在±10%)时状态。

稳态生物富集系数/稳态生物富集系数 steady state bioconcentration factor, BCF_{ss}

在稳态下,试验生物体(或特定组织)内某种受试物质浓度与试验介质中该物质浓度的比率。

正辛醇-水分配系数 octanol-water partition coefficient, P_{ow}

物质在正辛醇-水两相介质中达到平衡时的浓度之比,通常以 P_{ow}表示。

吸收速率常数 uptake rate constant, k₁

受试物暴露于含有受试物质的介质中,在体或其特定组织中受试物浓度增加速率,通常以 d⁻¹表示。

消除速率常数 depuration (loss) rate constant, k₂

受试物从含有受试物质的介质中转移到不含受试物质的介质中,在体或其特定组织中受试物浓度降低的速率,通常以 d⁻¹表示。

受试物质量

水中溶解度

正辛醇-水分配系数(P_{ow})

水溶性

目 次

前言	I
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 受试物信息	1
4 方法概述	2
5 仪器设备	2
6 试验准备	3
7 试验程序	3
8 质量保证与质量控制	6
9 数据与报告	6
附录 A (资料性附录) 合格稀释水的化学特性	8
附录 B (资料性附录) 推荐的试验鱼	9
附录 C (资料性附录) 吸收阶段和清除阶段持续时间的预测	10
附录 D (资料性附录) $\lg P_{ow}$ 为 4 的受试物的生物浓度试验取样的理论样例	12
附录 E (资料性附录) 生物富集系数指数模型的计算	13
参考文献	15

化学品 生物富集 流水式鱼类试验

1 范围

本标准规定了化学品生物富集流水式鱼类试验的方法概述、试验准备、试验程序、质量保证与质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试与评价 $\lg P_{ow}$ 值在 1.5~6.0 之间的稳定的有机化学品的生物富集性,也适用于测试与评价 $\lg P_{ow} > 6.0$ 的高度亲脂性的物质的生物富集性。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

生物富集 bioconcentration

试验生物体(或特定组织)内某种受试物的浓度相对于试验介质中该物质浓度的增加。

2.2

生物富集系数 bioconcentration factor, BCF

试验吸收阶段的任何时间,试验生物体(或特定组织)内某种受试物浓度与试验介质中该物质浓度的比率。BCF 也可由动力学方程速率常数(K_1/K_2)直接计算得到,记为 BCF_K 。

2.3

稳定态 plateau or steady-state

受试物在鱼体中浓度对应时间所绘的曲线与时间轴趋于平行(变化幅度在 $\pm 20\%$)时状态。

2.4

稳定态生物富集系数/稳定态生物蓄积系数 steady state bioconcentration factor, BCF_{ss}

在稳定态下,试验生物体(或特定组织)内某种受试物浓度与试验介质中该物质浓度的比率。

2.5

正辛醇-水分配系数 octanol-water partition coefficient, P_{ow}

物质在正辛醇-水两相介质中达到平衡时的浓度之比。通常以 P_{ow} 表示。

2.6

吸收速率常数 uptake rate constant, K_1

受试鱼暴露于含有受试物质的介质中,鱼体或其特定组织中受试物浓度增加速率。通常以 d^{-1} 表示。

2.7

清除速率常数 depuration (loss) rate constant, K_2

受试鱼从含有受试物质的介质中转移到不含受试物质的介质中后,鱼体或其特定组织中受试物浓度降低的速率。通常以 d^{-1} 表示。

3 受试物信息

- a) 水中溶解度;
- b) 正辛醇-水的分配系数(P_{ow});
- c) 水解性;

- d) 在太阳光或模拟太阳光和在生物富集试验光照条件下,测定化学品在水中的光转化作用;
- e) 表面张力(若无 P_{ow} 时);
- f) 蒸气压;
- g) 快速生物降解性试验结果;
- h) 受试物质对受试鱼的毒性,如 LC_{50} 值;
- i) 合适的分析方法(已知准确度、精确度和灵敏性);
- j) 样品制备和储存的详细资料;
- k) 受试物质在水中和鱼体内的分析检测限;
- l) 当受试物质使用 ^{14}C 标记时,应了解放射物质携带杂质的百分率。

4 方法概述

4.1 原理

生物富集试验包括两个阶段:暴露(吸收)阶段和暴露后(清除)阶段。

在吸收阶段,将受试鱼暴露于两个或两个以上浓度的受试物溶液中。吸收阶段一般为 28 d,除非能证明在此之前已达到吸收平衡。附录 C 中的方程式可用于预测吸收阶段的天数和稳定状态时间。如果在 28 d 内尚未达到稳定状态,吸收阶段应延长直至稳定状态为止,最长为 60 d。

在吸收达到稳定状态后,将受试鱼转入不含有受试物的相同的介质,清除阶段开始。清除阶段必不可少,除非在吸收阶段受试物的吸收量可忽略(如, $BCF < 10$)。

在整个测试过程中,定时测定鱼体(或其特定组织)中的受试物含量。除两组不同浓度的受试物试验之外,应设置空白对照组。

生物富集系数(BCF)的计算选用一次指数模型。如果一次指数模型明显不适用时,应选用更复杂的模型(见附录 E)。

用实测的受试物在鱼体内的浓度和溶液中的浓度拟和模型,并计算吸收速率常数、清除速率常数和生物富集系数的置信限。

BCF 值一般以鱼体总湿重表示。如果鱼体足够大或鱼可以分为可食用部分(鱼肉)和非食用部分(内脏)时,可用特定组织或器官(如肌肉、肝)进行分析。对于高亲脂性受试物质($P_{ow} > 3$),在测定受试物质在受试鱼体内浓度的同时,应测定受试鱼体的脂肪含量。

4.2 参比物

无推荐参比物。

5 仪器设备

- a) 溶解氧测定仪;
- b) 水硬度计;
- c) pH 计;
- d) 分析天平;
- e) TOC 分析仪;
- f) 受试物分析仪器;
- g) 样品前处理仪器设备;
- h) 连续配制和分配系统;
- i) 水质测定仪器;
- j) 化学惰性材料制成的水族工具;
- k) 温度控制设备。

6 试验准备

6.1 受试鱼类

6.1.1 鱼种的选择

鱼种选择的标准:易于获得、大小合适和实验室内易于驯养。也包括娱乐、商业、生态学价值以及对灵敏和已成功选用等。

推荐的试验鱼种见附录 B。也可用其他鱼种,但试验条件应作相应调整,并在报告中说明鱼种选择理由和试验方法。

6.1.2 鱼的驯养

受试鱼应在与试验温度相同的水中驯养 2 周以上,每天投喂相当于鱼体重 1%~2% 的饵料。应测定饵料的脂肪和总蛋白含量。建议测定农药和重金属含量。

在受试鱼开始驯养 48 h 内,记录其死亡率并按下列标准评判:

- a) 7 d 内试验鱼死亡率大于 10%:舍弃整批鱼;
- b) 7 d 内试验鱼死亡率在 5%~10% 之间:再驯养 7 d;
- c) 7 d 内试验鱼死亡率小于 5%:接收本批鱼。如果在第二个 7 d 内,试验鱼死亡率超过 5%,舍弃整批鱼。

畸形或患病鱼不能作为受试鱼,应舍弃。试验期间及试验前两周不对鱼做任何防治疾病处理。

如果试验中使用成年鱼,应报告受试鱼是雄性还是雌性或两者混用。如果试验中雄鱼和雌鱼混用时,两者的脂肪含量应没有显著性差异。雄鱼和雌鱼应一起喂养。

6.2 驯养用水

驯养用水一般来源于无污染、相同水质的天然水。受试鱼种在驯养用水中能够存活、成长和繁殖,并且在驯养期间不产生任何外观或行为异常。水的特性指标至少应包括 pH、硬度、颗粒物、总有机碳、铵及亚硝酸盐的含量、碱度和含盐量(仅对海水鱼类而言)。附录 A 推荐了淡水和海水的部分参数的最大浓度值。

7 试验程序

7.1 准备

7.1.1 试验容器

试验容器应使用化学惰性材料制成,对受试验物质没有明显的吸附。建议使用特氟龙材料、不锈钢或玻璃管,将塑料软管减少到最小量。对于有高吸附系数的物质,要求使用硅烷化玻璃。使用过的容器必须废弃。

7.1.2 试验用稀释水

稀释水来源和水质同驯养用水。

在整个试验期间,试验用水的质量应保持稳定不变,pH 值应保持 6.0~8.5,pH 值的变化幅度应保持 ± 0.5 的范围。稀释水应定期取样分析,包括测定重金属(如 Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni)、主要的阴离子和阳离子(如 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , SO_4^{2-} 、杀虫剂(如总有机磷和总有机氯农药)、总有机碳和悬浮物。

稀释水中的天然颗粒物最大可接受质量浓度为 5 mg/L(孔径 0.45 μm 滤膜的截留干物质),总有机碳最大可接受数值为 2 mg/L(见附录 A)。整个试验过程中,试验容器内其他来源的有机碳不应超过来自于受试物的有机碳。如使用助溶剂,不应超过 10 mg/L($\pm 20\%$)。

7.1.3 受试物溶液的配制

配制适当浓度的受试物贮备液。

建议在稀释水中通过简单地混合或搅拌受试物来配制贮备液。应尽量不用或慎用助溶剂或分散

剂。可以使用的助溶剂有乙醇、甲醇、乙二醇一甲基醚、乙二醇二甲醚、二甲基甲酰胺和三甘醇。可以使用的分散剂有 Cremophor RH40(乙氧基化氢化蓖麻油)、吐温 80(脱水山梨醇单油酸酯聚氧乙烯醚)、0.01%甲基纤维素和 HCO-40(乙氧基化氢化蓖麻油)。

每天至少更换试验槽 5 倍体积的水量。试验开始前 48 h 应检查贮备液和稀释水的流速,试验期间每天至少核查一次。检查每个试验槽的水流流速,以保证每个试验槽内或各个试验槽之间水流流速变化均不超过 20%。

7.2 试验操作

7.2.1 预备试验

优化试验条件,如受试物浓度的选择、吸收阶段和清除阶段持续时间。

7.2.2 试验设计

鱼类要暴露在受试物至少 2 个浓度的水溶液中。通常,较高(或最高)的浓度应为急性 LC_{50} 的 1%,同时该浓度应为水中受试物的分析方法检出限的 10 倍以上。最高测试浓度也可以通过 96 h LC_{50} 除以恰当的急慢性比率来估计。如果可能,也可以选择其他的浓度系列。如果受到 LC_{50} 的 1%和分析下限的限制而不能配制上述浓度时,可以采用小于 10 倍的浓度级差,或考虑使用 ^{14}C 标记的受试物。任何情况下不得采用大于受试物溶解度的浓度。

当试验中使用了助溶剂时,其体积浓度应小于 0.1 mL/L,而且在所有试验容器中的浓度应相同。应测定助溶剂的有机碳含量。

应设立稀释水对照组或助溶剂对照组。

7.2.3 暴露条件

7.2.3.1 吸收阶段的持续时间

吸收阶段持续时间的预测可以从实践经验或凭借一定的经验关系式获得,如利用受试物的水溶性或辛醇-水的分配系数(见附录 C)。

吸收阶段的持续时间应持续 28 d,除非能证实试验可以较早达到平衡。如果 28 d 时还未达到稳定状态,应延长吸收阶段,进一步测定,直到达到稳定状态或 60 d。选时间较短的一种方法。

7.2.3.2 清除阶段的持续时间

清除阶段的时间一般为吸收阶段时间的一半(见附录 C 对估算的解释)。如果达到 95%清除量所需的时间过长,例如超过了样品吸收阶段的 2 倍时间(如超过 56 d),那么清除阶段的时间可以缩短(例如到受试物浓度小于稳定状态浓度的 10%为止)。

使用一次指数模型的化学物质,需要较长的清除时间以测定清除速率常数。清除阶段时间应取决于鱼体内受试物浓度测定的分析下限。

7.2.3.3 受试鱼的数量

各试验浓度所需受试鱼的尾数应保证每次取样测定,每次取样最少 4 尾鱼。如果要求的更大的统计样本,则需要更多鱼尾数。

试验时,应选择体重相近的受试鱼,最小的鱼体重不小于最大鱼体重的三分之二。所有的受试鱼应是相同鱼龄,相同来源。应准确记录受试鱼的质量和鱼龄。建议在试验前对受试鱼取样称重。

7.2.3.4 承载量

推荐使用的承载率为鱼重(湿重) $0.1\text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L}) \sim 1.0\text{ g}/(\text{d} \cdot \text{L})$ 。如果受试物浓度波动能保持在 $\pm 20\%$ 内,并且溶解氧浓度不低于 60%饱和值时,可以提高承载量。

在选择适当的承载量时,应考虑鱼种要求的正常生长环境。

7.2.3.5 喂养

在试验期内,使用驯养期间相同的饵料。每天投喂相当于鱼体重 1%~2%的饵料。建议在试验前对受试鱼取样称重。可根据最近取样的鱼体重来估算各试验槽中鱼的质量,不得称量在试验槽中的鱼的质量。

每天喂食之后的 30 min~60 min 以内,用虹吸清除试验槽中剩余的饵料和鱼类排泄物。在整个试验期间尽可能地保持试验槽干净,以保证有机物的浓度尽可能的低。

7.2.3.6 光照和温度

试验期间,光周期应为 12 h~16 h,温度应控制在受试鱼种最适宜温度的 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内(见附录 B)。

7.2.4 水质测定的频率

试验时应测定所有试验容器中的溶解氧、TOC、pH 和温度,对照组和较高或最高试验浓度组应测定总硬度和盐度。在吸收阶段,至少应测定 3 次溶解氧,即试验开始时、吸收阶段中期和结束时。清除阶段每周 1 次。TOC 的测定应在投入受试鱼前(吸收阶段前 24 h~48 h)、吸收阶段和清除阶段至少每周 1 次。pH 应在各个阶段的开始和结束时测定。每个试验测定 1 次硬度。每日应测量温度,至少要连续监测一个试验容器中的温度。

7.2.5 受试鱼和水的取样及分析

7.2.5.1 受试鱼和水的取样计划

在加入受试鱼之前、吸收阶段和清除阶段,均应采集试验槽中的水样进行受试物浓度测定。水样采集频率应不小于鱼样采集频率,且应在投饵之前进行。

在吸收阶段至少采集鱼样 5 次;在清除阶段,至少 4 次。在有些情况下,仅这几个样品很难计算出一个足够精确的 BCF 值,因此在两个阶段中建议增加取样次数(参见附录 D)。

附录 D 给出一个取样计划表样例。用其他 P_{ow} 的估算值去计算吸收 95% 的暴露时间,也可得出相关的计划表。

在吸收阶段应连续取样测定,直到出现稳定态或 28 d 试验期(二者取其短)。如果 28 d 里尚未达到稳定态,应继续取样直到达到稳定态或达 60 d(二者取其短)。在清除阶段开始前,把试验鱼转入清水容器中。

7.2.5.2 取样和样品制备

按虹吸原理,使用惰性材料管从试验槽的中部区域采集水样供分析测定。应保持容器尽可能的干净,并在吸收和清除阶段检测总有机碳的含量。

每次取鱼样时,从试验槽取出适当数量的受试鱼(最少 4 尾),快速用水冲洗受试鱼,吸干体表水分,用最人道的方法快速致死后称重。

鱼样和水样采集后应尽快测定,以避免降解或其他方面的损失,并近似计算吸收和清除速率。

不能即时测定样品时应用适当的方法保存样品。试验开始前应掌握保存特定受试物的方法、贮存时间和提取方法等。

7.2.5.3 分析方法

对于特定的受试物,需要检查分析方法的准确性和重现性,以及水和鱼体中该受试物的回收率。另外,稀释水中不得检出受试物。必要时,应校正试验中测得的 C_w 和 C_f 值。

7.2.5.4 鱼样测定

在试验中使用了放射性标记物质时,则能够测定放射标记物总量(包括母体和代谢物),或者清洗样品后单独测定母体受试物,在稳定态或吸收阶段末(二者取其短)也可鉴定代谢主产物。如果根据放射性标记残余物总量得到的 BCF 值不小于 1 000,则有必要鉴别稳定态时鱼体组织中的受试物总残留的降解率是否不小于 10%,特别对于农药等特殊类别的受试化合物。如果鱼体组织中的受试物总残留的降解率不小于 10%,则需测定受试物在水中的降解。

通常应测定每尾鱼体内的受试物含量,如果这不可能做到,则每次取样后将相同试验浓度的受试鱼合并,但这将无法进行数理统计分析。如果确实需要进行数理统计,在试验设计时就需充分考虑样品量(受试鱼尾数)。

BCF 值可表达为试验鱼体总湿重的函数,对于高亲脂性物质,也可表达为鱼体脂肪含量的函数。如果可能,每次取样都测定鱼样的脂含量。推荐三氯甲烷/甲醇萃取法为标准方法。不同的测试方法得

到的结果不会完全相同,所以应给出所用方法的详细步骤。如果可能,脂肪测定和受试物测定应使用相同的样品萃取物,因为受试物测定的色谱分析通常都要去除脂肪。试验结束时与开始时的试验鱼的脂肪含量(以 mg/kg 湿重表示)差值应不大于±25%,同时应报告鱼体组织干重,以了解脂肪含量从湿重转化为干重的比率。

8 质量保证与质量控制

有效的试验应满足以下的条件:

- a) 温度变动小于±2℃;
- b) 溶解氧浓度不小于60%空气饱和值;
- c) 控制受试物在试验照明条件下发生光转化作用,滤除波长小于290 nm的紫外辐射,避免试验鱼暴露于异常的光化产物;
- d) 在吸收期,试验容器中的受试物浓度保持在测定平均值的±20%范围内;
- e) 直至试验结束时,对照和试验组鱼的死亡率或其他不良影响或疾病小于10%;当试验延长数周或数月时,两组中试验鱼死亡或其他不利影响每月应小于5%,并且在整个过程中不大于30%。

9 数据与报告

9.1 数据处理

将鱼体(或鱼体特定组织)的受试物浓度按时间绘制在坐标纸上形成曲线,如果曲线已经达到了一个稳定的状态,也就是说,对于时间轴已经变成了一条近似的渐近线,用式(1)计算稳定状态的生物富集系数(BCF_{ss}):

$$BCF_{ss} = \frac{C_f}{C_w} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- C_f——鱼体组织中受试物的平均浓度;
- C_w——试验液中的受试物平均浓度。

当稳定状态没有达到时,也能够计算出80%或95%稳定态的BCF_{ss}值。

动力学富集系数(BCF_K)也可用一次指数方程的吸收速率常数 K₁ 和清除速率常数 K₂ 的比率来确定。清除速率常数 K₂ 通常通过清除曲线(即在图上描绘出的鱼体中受实物浓度对时间的曲线)来确定。吸收速率常数 K₁ 则可根据给定的 K₂ 值和来自于吸收曲线的 C_f 值计算获得,详见附录 E。求取 BCF_K 和 K₁、K₂ 的更好方法是应用非线性参数估计方法软件,否则可用图表法计算 K₁、K₂ 值。如果清除曲线明显不是一次指数方程,则应使用更复杂的方法(见附录 C)和生物统计学方法。

9.2 试验报告

试验报告必须包括以下资料:

- a) 受试物:
 - 物理属性及相关的物理化学性质;
 - 化学性质数据,包括有机碳含量;
 - 如果使用放射性标记物质,标记原子的准确位置和有关放射性杂质的百分比。
- b) 试验生物:
 - 学名、品系、来源、预处理、驯养、年龄和个体大小等。
- c) 试验条件:
 - 所用试验程序;
 - 所用光源类型、特性及光照周期;

- 试验设计,例如试验槽的大小和数量、换水频率、重复数、每个重复的试验鱼数、受试物浓度的个数、吸收期和清除期的持续时间、鱼和水的取样频率;
- 制备试验储备液的方法和储备液更新的频率(当使用了溶剂时,其浓度、对试验液的有机碳含量贡献率);
- 设定的试验浓度、试验容器中测定的浓度平均值和其标准偏差、分析方法;
- 稀释水来源、预处理描述、试验鱼在水中生活能力的表现和水质特性:pH、硬度、温度、溶解氧浓度、余氯水平(如果有测定)、总有机碳、悬浮颗粒物、试验介质的含盐量和任何其他测定结果;
- 试验容器中的水质、pH、硬度、TOC、温度、溶解氧;
- 喂食的详细信息,如饵料类型、来源、成分(至少包括脂肪和蛋白质含量)、投喂量和频率;
- 鱼和水样的处理的信息,包括详细的准备、贮存、萃取、对受试物和脂肪含量的分析程序和精确度。

d) 结果:

- 预备试验得到的结果;
- 对照组和各暴露组的鱼的死亡率、观察到的鱼的异常行为;
- 鱼的脂肪含量;
- 曲线(包括所有测试数据),表明直到稳定态吸收和清除阶段鱼体中的受试物情况;
- 对所有取样时间的 C_i 和 C_w 值(包括标准偏差和变化范围)、对照组 C_w 值以及本底值(C_i 用 mg/g 整个鱼体湿重或鱼体特殊组织如脂肪湿重或 mg/kg 表示, C_w 用 mg/g 或 mg/kg 表示);
- 稳定态生物富集系数(BCF_{ss})和动力学富集系数(BCF_K),如有可能,95%置信限的吸收和清除速率常数(以相关的整鱼、鱼体总脂肪含量或其特殊组织表示),置信限和标准偏差,以及各受试物浓度的计算和数据分析方法;
- 当使用放射性标记物质时,在需要的情况下,测得的任何代谢产物;
- 试验中的任何异常情况、试验程序的调整及其他相关信息;
- 其他说明事项。

e) 结果讨论:

- 测定方法研究的预试验结果应尽可能避免出现类似“方法检测限下未检测到”的结果,因为这将无法用于计算速率常数。

附录 A
(资料性附录)
合格稀释水的化学特性

合格稀释水的化学特性见表 A. 1。

表 A. 1 合格稀释水的化学特性

物 质	极限浓度
颗粒物质	5 mg/L
总有机碳	2 mg/L
游离氨	1 μg/L
余氯	10 μg/L
总有机磷农药	50 ng/L
总有机氯农药与多氯联苯	50 ng/L
总有机氯	25 ng/L
铝	1 μg/L
砷	1 μg/L
铬	1 μg/L
钴	1 μg/L
铜	1 μg/L
铁	1 μg/L
铅	1 μg/L
镍	1 μg/L
锌	1 μg/L
镉	100 ng/L
汞	100 ng/L
银	100 ng/L

附录 B
(资料性附录)
推荐使用的试验鱼

B.1 推荐使用的试验鱼(表 B.1)

表 B.1 推荐使用的试验鱼

试验鱼	试验温度范围/℃	试验用鱼体长/cm
斑马鱼(<i>Brachydanio rerio</i>)	20~25	3.0±0.5
稀有鮡鲫(<i>Gobiocypris rarus</i>)	21~25	3.0±0.5
剑尾鱼(<i>Xiphophorus helleri</i>)	21~25	3.0±0.5
黑头软口鲮(<i>Pimephales promelas</i>)	20~25	5.0±2.0
鲤鱼(<i>Cyprinus carpio</i>)	20~25	5.0±3.0
青鳉(<i>Oryzias latipes</i>)	20~25	4.0±1.0
孔雀鱼(<i>Poecilia reticulata</i>)	20~25	3.0±1.0
蓝鳉太阳鱼(<i>Lipomis macrochirus</i>)	20~25	5.0±2.0
彩虹大马哈鱼(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	13~17	8.0±4.0
三刺鱼(<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	18~20	3.0±1.0

上表所列淡水鱼易饲养且常年都可采集得到,然而海水鱼种和河口鱼种可能难于采集。在控制疾病或寄生虫的条件下,它们也可以在养鱼场或实验室中饲养和繁殖,这样就能保证试验鱼的健康和知其来源。

附录 C
(资料性附录)

吸收阶段和清除阶段持续时间的预测

C.1 吸收阶段持续时间的预测

在试验开始前,估算 K_2 值。根据 K_2 和 P_{ow} 或水溶解度(S)的经验关系式估计达到一定百分比稳定态的时间。

例如从经验关系式(C.1)中可以得到 K_2 的估算值:

$$\lg K_2 = -0.414 \lg P_{ow} + 1.47 \quad (r^2 = 0.95) \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

如果分配系数 P_{ow} 未知,可用受试物水溶性估算 P_{ow} 的值,见式(C.2):

$$\lg P_{ow} = 0.862 \lg S + 0.710 \quad (r^2 = 0.994) \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

式中:

S ——水溶解度,单位为摩尔每升(mol/L)($n=36$)。

这些关系式仅适用于 $\lg P_{ow}$ 值在 2~6.5 之间的化学品。

到达一定百分比稳定态的时间,可用 K_2 值根据描述吸收和清除的一次指数方程来估算,见式(C.3):

$$\frac{dC_f}{dt} = K_1 \cdot C_w - K_2 \cdot C_f \quad \dots\dots\dots (C.3)$$

当 C_w 是常数时,

$$C_f = \frac{K_1}{K_2} \cdot C_w (1 - e^{-K_2 t})$$

当接近稳定态时($t \rightarrow \infty$),式(C.3)简化为:

$$C_f = \frac{K_1}{K_2} \cdot C_w$$

或

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{K_1}{K_2} = BCF$$

那么 $\frac{K_1}{K_2} \cdot C_w$ 就是稳定态鱼体中受试物浓度的近似值($C_{f,s}$)。

式(C.3)可改写为:

$$C_f = C_{f,s} \cdot (1 - e^{-K_2 t}) \quad \dots\dots\dots (C.4)$$

或

$$\frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-K_2 t}$$

当 K_2 用式(C.1)或式(C.2)估算出后,应用式(C.4)就可估计达到一定百分比稳定态的时间。

作为一个准则,为得到统计上可接受数据(BCF_K),统计上最合适的吸收阶段的时间,是指在鱼体中受试物浓度的对数对线性时间轴绘制曲线,达到稳定态的中点或 $1.6/K_2$ (即 80% 稳定态)、但小于 $3.0/K_2$ (即 95% 稳定态)。

根据式(C.4),达到 80% 稳定态的时间为:

$$0.80 = 1 - e^{-K_2 t_{80}} \quad \dots\dots\dots (C.5)$$

或

$$t_{80} = \frac{1.6}{K_2}$$

同样,达到 95% 稳定态的时间为:

$$t_{95} = \frac{3.0}{K_2}$$

.....(C. 6)

示例:

受试物 $\lg P_{ow}=4$ 的吸收阶段的持续时间可用式(C. 1)、式(C. 5)和式(C. 6)来计算:

$$\lg K_2 = -0.414 \times 4 + 1.47$$

$$K_2 = 0.652 \text{ d}^{-1}$$

$$80\% \text{ 稳定态时间} = 1.6 \div 0.652, \text{ 即 } 2.45 \text{ d}(59 \text{ h})$$

或

$$95\% \text{ 稳定态时间} = 3.0 \div 0.652, \text{ 即 } 4.60 \text{ d}(110 \text{ h})$$

类似地,受试物溶解度 $S=10^{-5} \text{ mol/L}$ (即 $\lg S=-5.0$) 的吸收阶段持续时间可用式(C. 1)、式(C. 2)、式(C. 5)和式(C. 6)计算:

$$\lg(P_{ow}) = -0.862 \times (-5) + 0.710 = 5.02$$

$$\lg K_2 = -0.414 \times 5.02 + 1.47$$

$$K_2 = 0.246 \text{ d}^{-1}$$

$$80\% \text{ 稳定态时间} = 1.6 \div 0.246, \text{ 即 } 6.5 \text{ d}(156 \text{ h})$$

或

$$95\% \text{ 稳定态时间} = 3.0 \div 0.246, \text{ 即 } 12.2 \text{ d}(293 \text{ h})$$

$$\text{或者用 } t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31(\text{h}) \text{ 来计算达到充分稳定态的时间。}$$

C.2 清除阶段持续时间的预测

试验鱼体内受试物起始浓度下降一定百分比所需要的时间可通过描述吸收和清除的一阶指数方程来预测。

对于清除阶段, C_w 假设为零,则方程式变为式(C. 7):

$$\frac{dC_f}{dt} = -K_2 \cdot C_f$$

.....(C. 7)

或:

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-K_2 t}$$

式中:

$C_{f,0}$ ——起初阶段的起始浓度。

达到 50% 清除率所需要的时间(t_{50}),见式(C. 8):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-K_2 t_{50}}$$

或:

$$t_{50} = \frac{0.693}{K_2}$$

.....(C. 8)

同样,达到 95% 清除率的时间(t_{95}),见式(C. 9):

$$t_{95} = \frac{3.0}{K_2}$$

.....(C. 9)

假设在吸收阶段吸收了 80%($1.6/K_2$),在清除阶段要清除 95%($3.0/K_2$),那么清除阶段持续时间约为吸收阶段的两倍。

这些估算均以吸收和清除模式都遵循一次指数方程为假定条件。如果明显没有遵从一次指数方程,则应该采用更复杂的模型。

附录 D
(资料性附录)

lgP_{ow}为 4 的受试物的生物浓度试验取样的理论样例

lgP_{ow}为 4 的受试物的生物浓度试验取样的理论样例见表 D.1。

表 D.1 lgP_{ow}为 4 的受试物的生物浓度试验取样的理论样例

试验鱼取样	取样时间		水样数	每次鱼样的尾数
	要求最低的频率/d	额外取样/d		
吸收阶段	-1		2 ^a	加入 45~80 尾鱼
	0		2	
第一次	0.3		2	
		0.4	(2)	
第二次	0.6		2	
		0.9	(2)	(4)
第三次	1.2		2	4
		1.7	(2)	(4)
第四次	2.4		2	4
		3.3	(2)	(4)
第五次	4.7		2	6
清除阶段				把鱼转至清水中
	5.0			4
第六次		5.3		(4)
	5.9			4
第七次		7.0		(4)
	9.3			4
第八次		11.2		(4)
	14.0			6
第九次		17.5		(4)
注：对于 lgP _{ow} 为 4.0 的受试物 K ₂ 的试验前估算为 0.625 d ⁻¹ 。那么试验总时间为 3×吸收阶段=3×4.6 d,即 14 d。具体计算见附录 C。				
^a 最少替换 3 个试验槽体积的水之后采水样。 如果有额外取样,括号中的数是鱼或水的样品数。				

附录 E
(资料性附录)
生物富集系数指数模型的计算

E.1 模式识别

大多数生物富集过程可用简单的二次/二参数模型来描述,在清除阶段,将鱼体内受试物浓度描绘在半对数纸上,可得到一条直线(若清除过程的图形不是直线,则应使用更复杂的模型)。

E.2 图解法计算清除速率常数 K_2

在半对数纸上绘出时间对鱼体中受试物浓度的曲线,该线的斜率即为 K_2 。

$$K_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$

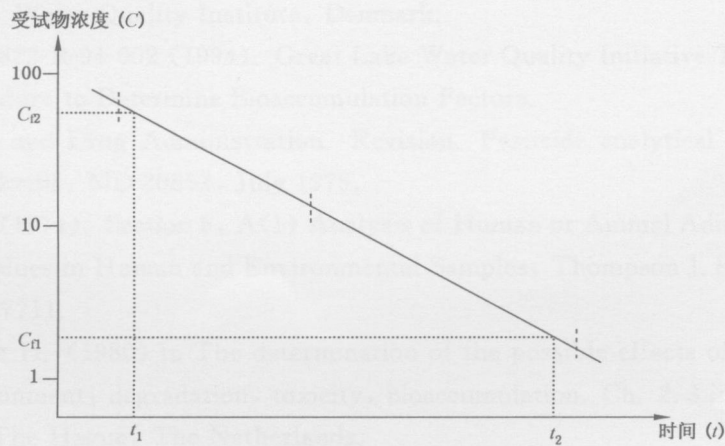


图 E.1 计算清除速率常数 K_2 图解

值得指出的是,回归直线如果有较大的偏差意味着该化学品可能有比一次指数方程更复杂的降解模型。图解法可直观地判断降解是否属于一次指数方程类型。

E.3 图解法计算吸收速率常数 K_1

给定 K_1 ,可用式(E.1)计算 K_1 :

$$K_1 = \frac{C_f K_2}{C_w \times (1 - e^{-K_2 t})} \dots\dots\dots (E.1)$$

C_f 值可平滑吸收曲线的中点读取,此曲线用鱼体中受试物浓度的对数值对时间绘制。

E.4 吸收和清除速率常数的计算机模型

求取生物富集系数、速度常数 K_1 和 K_2 的最佳方法是用计算机来进行非线性参数估算,在给定一组连续时间的浓度数据下,程序可以求出 K_1 和 K_2 值,数学模型为:

$$C_f = C_w \cdot \frac{K_1}{K_2} \times (1 - e^{-K_2 t}) \quad \text{当 } 0 < t < t_c \text{ 时} \dots\dots\dots (E.2)$$

$$C_t = C_w \cdot \frac{K_1}{K_2} \times [e^{-K_2(t-t_c)} - e^{-K_2t}] \quad \text{当 } t > t_c \text{ 时} \quad \dots\dots\dots (E.3)$$

式中：
 t_c ——吸收阶段结束的时间。
用此模型可得出 K_1 和 K_2 标准差估计值。
在大多数情况下， K_2 可以比较精确地从清除曲线进行估算，并且如果同时估算 K_1 和 K_2 两个参数的话，它们之间存在着显著的相关性，因此建议首先从清除曲线仅估算 K_2 值，然后再用非线性回归方法从吸收曲线估算 K_1 值。



$$K_1 = \frac{C \times (1 - e^{-K_2 t})}{t \times (C - C_w)}$$