



稀有鮡鲫对重铬酸钾和3,4-二氯苯胺急性毒性研究

张京佶^{1,2}, 殷浩文², 赵华清²

(1. 同济大学 生命科学与技术学院, 上海 200092;
2. 上海市检测中心 生物与安全检测实验室, 上海 201203)

【摘要】 目的和方法 稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)作为一种本土特有的小型鱼类,是我国正在标准化的化学品毒性测试生物之一。为评价稀有鮡鲫鱼类急性毒性实验中效应的稳定性和可重复性,研究优化筛选了重铬酸钾和3,4-二氯苯胺两种化学品,分别在单一实验室内及不同实验室内进行急性毒性验证实验。**结果** 对于来源相同、体长固定的稀有鮡鲫,无论在实验室内还是实验室内,两组化学品的96 h LC₅₀值均在 $\bar{x} \pm 2s$ 的质量控制范围之内,所有结果体现了很好的稳定性和可重复性。**结论** 根据研究获得的数据可建立一个有效的稳定性和可重复性衡量数据库,用来评估之后其他单个实验的可靠性;稀有鮡鲫作为一种具有潜力的生态毒性测试的生物种类,具有成为标准实验动物的潜能。

【关键词】 稀有鮡鲫;急性毒性;稳定性;可重复性;重铬酸钾;3,4-二氯苯胺

【中图分类号】 Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0057-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.013

Acute toxicity of potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*)

ZHANG Jing-ji^{1,2}, YIN Hao-wen², ZHAO Hua-qing²

(1. School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;
2. Bioassay and Safety Assessment Laboratory, Shanghai Academy of Public Measurement, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective and Methods As a local species, Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) has been one of the standardized test fish for chemical toxicity tests in China. By optimal screening, the acute toxicity of potassium bichromate and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) was determined to evaluate repeatability and accuracy for *Gobiocypris rarus* in one laboratory and between different laboratories. **Result** Based on a proper data analysis, for the two chemicals performed with the same fish, all 96 h LC₅₀ values were within mean (\bar{x}) and upper and lower control limits ($\pm 2s$) in both inner test (in one laboratory) and outer test (between different laboratories). **Conclusions** From these results, a valid database could also be established to evaluate one single test. In addition, *Gobiocypris rarus* will not only be a potential test species for ecotoxicity tests, but also recommended as a standard laboratory animal.

【Key words】 Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*); Acute toxicity; Repeatability; Accuracy; Potassium bichromate; 3,4-dichlorophenol

许多化学品对环境和人体健康存在危害,通过标准化的毒性检测对其进行危害鉴别并实施管理是当今国际上新的趋势。OECD、ISO、USEPA等组织机构关于化学品的毒性测试方法都涉及了鱼

类^[1-8],同时为了实验数据的可靠性、可比性和通用性,这些方法也推荐了一些通用的实验鱼种,如:斑马鱼(*Danio rerio*)、黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)以及日本青鳉(*Oryzias latipes*)等。

[基金项目]上海市科学技术委员会技术标准专项(09DZ0504500)。

[作者简介]张京佶(1983-),女,上海市人,工程师,硕士研究生。研究方向:生态毒理学。E-mail: zhangjj@apm.sh.cn

近年来,我国也陆续颁布了一些化学品鱼类毒性实验标准方法,但国内使用的实验鱼大多还局限于国际通用种。为了有效保护我国的生态环境和人体健康,同时也为我国化学品管理提供有力的技术支撑。目前,稀有鮡鲫作为标准实验鱼种的工作正在展开^[9-14],它也是目前被推荐实验用鱼中唯一的本土鱼种。

稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus* Ye et Fu)是我国长江上游的一种特有小型鱼类^[15-16]。因其性成熟时间短,繁殖季节长,产卵量较大,在人工控制饲养条件下可常年繁殖,具有成为标准实验动物的潜能^[15,17]。稀有鮡鲫的生物学特征研究已较为系统^[18-21],且在化学品测试和安全性评价、测试现场样品和污染指标、监测持久性污染物和内分泌干扰物等方面也有应用^[22-25],但生态毒理学应用研究还不够完善,尤其对标准化的化学品毒性测试结果的稳定性和可重复性验证研究数据缺乏。

我国化学品管理法规要求,鱼类急性毒性实验是必须在中国境内完成的测试项目之一^[26]。通过实验可获得化学品对中国受试生物的急性毒性数据,并为后续毒性实验的设计和观察提供依据。同时,由于急性毒性实验时间短,易操作,实验条件便于控制且在国家管理体系中属于基础数据要求等特点,成为我国法规要求的生态毒性实验中应用频次最高的一种方法。

本文参考国内外标准方法,将稀有鮡鲫作为实验材料;优化筛选了国际上常用的两种参比化学品进行单一实验室内和 6 个不同实验室间的重复实验,评价急性毒性实验结果的稳定性和可重复性。验证了稀有鮡鲫作为一种具有良好重现性的生态毒性测试用鱼种,具有成为标准实验动物的潜能。

1 材料与方法

在实验鱼种标准化研究中,生物测试体系的稳定性和可重复性是关键。因此,研究对实验生物、受试化学品、实验条件和方法以及实验设计等因素标准化后,进行多次单一实验室内和不同实验室间的鱼类急性毒性实验,从而评价稀有鮡鲫对化学品毒性效应的稳定性和可重复性。

1.1 实验生物

稀有鮡鲫由中国科学院水生生物研究所提供,为野生型封闭群(Ihb:IHB)。体长(3.0 ± 1.0)cm。

1.2 受试化学品筛选

为能准确科学地评价实验结果的稳定性和可重复性,选择有代表性的化学品是关键。通常此类物质应具有纯度高、稳定性好、水溶性高、水溶液浓度稳定、对环境和研究者危害相对较小、易于准确分析等特点^[27]。参考上述原则及国际上常用的参比化学品,优化筛选了无机物和有机物两大类各一个作为代表受试化学品。

重铬酸钾(potassium dichromate, Cr₂K₂O₇, GR, 上海国药集团化学试剂有限公司,批号 F2009063)作为一种被国际上最广泛认可和推荐的参比化学品,是水生毒性实验中最常见的无机参比物。采用最常规的参比化学品进行重复实验,获得的结果更为可靠,也更具可比性。

3,4-二氯苯胺(3,4-dichloroaniline, C₆H₅Cl₂N, 98%, Alfa Aesar,批号 10141038)是多种农药、医药、精细化工产品的重要中间体。作为除草剂的主要原料,广泛存在于环境中。由于其水溶性较低、毒性较大,实验过程相对复杂。但复杂实验条件下,考量鱼种效应的稳定性和可重复性会更有意义。

1.3 实验条件

实验用水为经活性炭过滤、紫外灭菌后曝气处理的自来水;pH 为 6.0 ~ 8.5;硬度为 0 ~ 250 mg CaCO₃/L;实验温度为 21 ~ 25℃;溶解氧浓度不低于空气饱和值的 60%。光照周期为 12 h-12 h;鱼的承载量小于 1.0 g/L。实验采用静态方式暴露,实验周期为 96 h。

1.4 实验方法

参考《OECD 化学品测试指南》^[1]和《国家环保部化学品测试方法》^[28]中鱼类急性毒性实验方法,分别进行重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺的实验室内重复实验和实验室间比对实验。

1.4.1 实验室内重复实验

重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺的暴露浓度分别为:50、85、145、250、425 mg/L 和 2、3.6、6.5、12、21 mg/L。另设 1 个空白对照;每个实验容器放入 7 尾鱼,不设平行组。

重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺急性毒性实验在实验室内各重复 18 次,其中每个化学品分 3 次,每次 6 组完成。上述实验通过固定实验条件和方法,在不同时间、不同人员、不同个体受试生物条件下,总体分析和验证实验结果的稳定性。

1.4.2 实验室间比对实验的设计

参考国际上对生物验证研究的要求,选择重铬

酸钾和 3, 4-二氯苯胺进行 6 个实验室间的数据比对,进一步验证稀有鮡鲫急性毒性实验的重复性和稳定性。参与比对的实验室有:上海市检测中心(SAPM)、中国科学院水生生物研究所(IHB,共进行 2 次比对实验)、南京环境科学研究所(NIES)、沈阳化工研究院安评中心(SYRICI)、华东师范大学(ECNU)、浙江大学农药与环境毒理研究所(IPET-ZJU)。

比对实验由本实验室确定实验方案,统一分发实验鱼和受试化学品,尽可能地减少系统误差的出现,相对保证了数据结果的可靠性和可比性。

1.5 数据处理

采用 Trimmed Spearman-Kärber 法计算 96 h LC₅₀ (半数致死浓度)值。

1.6 有效性分析

实验期间,无论是实验室内还是实验室间,每个单独实验都满足方法本身的有效性。

所有实验用鱼均由中国科学院水生生物研究所提供,来源和品系明确,鱼体健康无污染。临实验前,所有实验鱼已在实验室驯养 14 d 以上,驯养期间未发现疾病;实验开始前 7 d 内死亡率小于 5%。

表 1 两种化学品对稀有鮡鲫的急性毒性(96 h LC₅₀)

Tab.1 Acute toxicity of the two chemicals to *Gobiocypris rarus*

重铬酸钾 Potassium dichromate				3,4-二氯苯胺(3,4-dichloroaniline)			
次数 No.	96 h LC ₅₀ mg/L	次数 No.	96 h LC ₅₀ mg/L	次数 No.	96 h LC ₅₀ mg/L	次数 No.	96 h LC ₅₀ mg/L
1	134.02	10	176.86	1	7.26	10	6.49
2	111.75	11	109.45	2	5.27	11	6.84
3	225.15	12	264.72	3	7.26	12	6.92
4	193.11	13	220.97	4	5.23	13	6.43
5	159.08	14	150.81	5	5.87	14	4.42
6	288.43	15	284.41	6	7.35	15	8.10
7	145.78	16	198.68	7	6.69	16	6.72
8	177.22	17	105.24	8	5.69	17	5.21
9	153.87	18	181.84	9	8.75	18	8.06
平均值(\bar{x} , mg/L)		182.30		平均值(\bar{x} , mg/L)		6.59	
标准偏差(s , mg/L)		56.61		标准偏差(s , mg/L)		1.15	
变异系数(CV, %)		31.05		变异系数(CV, %)		17.41	

2.2 实验室间比对实验

实验室间两种化学品对稀有鮡鲫急性毒性实验结果见表 2。重铬酸钾和 3, 4-二氯苯胺的 96 h LC₅₀值分别在 135.73 ~ 416.93 mg/L 和 1.97 ~ 6.59 mg/L 之间;实验室间的变异系数分别为 36.86% 和

因此,实验用鱼满足方法要求,获得的数据相对可靠。

此外,所有毒性数据采用合适的统计方法计算后得出,结果具有一定的可比性。由此可见,本研究获得的数据科学有效。

2 结果

2.1 实验室内重复实验

暴露于高浓度重铬酸钾中的稀有鮡鲫表现为游动缓慢,身体多处发白,并逐渐溃烂,24 h 内大部分鱼死亡。18 次重复实验的 96 h LC₅₀ 值在 105.24 ~ 288.43 mg/L 之间;变异系数 < 35%。

暴露于高浓度 3,4-二氯苯胺中的稀有鮡鲫表现为游动缓慢,个别实验鱼沉于实验容器底部,24 h 内大部分鱼死亡。18 次重复实验的 96 h LC₅₀ 值在 4.42 ~ 8.75 mg/L 之间;变异系数 < 20%。

两种化学品急性毒性实验结果见表 1。根据表 1 的数据,按照 USEPA^[29] 对数据质量控制的要求,两种化学品对稀有鮡鲫的 96 h LC₅₀ 值均在质量控制范围($\bar{x} \pm 2s$)之内,稀有鮡鲫急性毒性实验在实验室内的稳定性良好。

41.21%。

根据表 2 的数据,两种化学品对稀有鮡鲫的 96 h LC₅₀ 值均在 $\bar{x} \pm 2s$ 之内,进一步证明了稀有鮡鲫急性毒性实验在实验室间的可重复性良好。

表 2 实验室间两种化学品对稀有鮕鲫的急性毒性(96h LC₅₀)Tab. 2 Acute toxicity of the two chemicals to *Gobiocypris rarus* between different laboratories

序号 No.	实验室 Lab	96 h LC ₅₀ (mg/L)	
		重铬酸钾 Potassium dichromate	3,4-二氯苯胺 3,4-dichloroaniline
1	SAPM	182.30	6.59*
2	IHB ¹⁾	261.40	1.97
3	IHB ²⁾	218.10	7.81
4	NIES	325.00	5.51
5	ECNU	235.30	2.60
6	SYRICI	416.93	5.28
7	IPET-ZJU	135.73	5.88
	平均值(\bar{x} , mg/L)	253.54	5.09
	标准偏差(s , mg/L)	93.46	2.10
	变异系数(CV, %)	36.86	41.21

1), 2): 分别为 2 次比对实验结果

3 讨论与结论

通过对数据的比较和分析发现,稀有鮕鲫急性毒性实验无论在实验室内还是在实验室间,都有着较好的稳定性和可重复性。实验室内重复实验验证显示,只要选择来源固定、年龄合适、健康状况良好的稀有鮕鲫;且暴露条件相对恒定,即使在不同人员、不同时间下进行实验,都能获得较为稳定的实验结果。而实验室间比对实验验证显示,虽然各数据间离散程度(变异系数)相较于单一实验室内偏大,但也都在同一数量级;且根据新化学物质危害评估准则^[29]中的化学品危害等级判定,数据上并无本质意义上的差别。因此,稀有鮕鲫急性毒性实验在不同实验室间的重复性也是可接受的。

通过标准化研究获得的批量数据可建立一个以统计学为基础的、行业可接受的质控区间。然后以此区间为参照,评估之后的其他单个实验或实验生物的可靠性。如:ISO(1996)^[6]斑马鱼急性毒性实验中,将斑马鱼对重铬酸钾 24 h LC₅₀ 值范围控制在 200 ~ 400 mg/L 之间以评估该批次斑马鱼的敏感性是否符合实验要求。根据 USEPA(1985)^[30],一般为计算结果的平均值(\bar{x})及标准差(s)。将实验获得的结果计算 2s,从第 5 或第 6 次数据后就可开始建立内部质量控制图,每次获得新数据后重新计算平均值(\bar{x})和上下质控限($\pm 2s$),直至 20 次,其后维持 20 个数据点,去旧留新。本研究实验室内 18 次重复实验结果显示,稀有鮕鲫对重铬酸钾和 3,4-二氯苯胺的 96 h LC₅₀ 值范围分别为 105.24 ~ 288.43 mg/L 和 4.42 ~ 8.75 mg/L;平均值(\bar{x})分别为 182.30 mg/L 和 6.59 mg/L;标准差(s)分别为 56.31 mg/L 和 1.15 mg/L。因此,可将两种化学品数据建立有效的稳定性和可重复性衡量数据库,形

成一个可靠的稀有鮕鲫急性毒性范围,评估之后其他单个实验的可靠性。

随着实验动物科学的发展,有关鱼类实验动物的验证研究日渐活跃,毒性实验所用的材料鱼,除了要求个体小、实验室易饲养外,更趋向于拥有系统的、科学的标准化研究以验证其用于实验的可靠性,如国际上常用的斑马鱼(*Danio rerio*)、日本青鳉(*Oryzias latipes*^[31]等。稀有鮕鲫是我国自行开发的水生实验动物,其标准化的验证研究国内外尚无报道。本研究通过我国本土的标准化的实验鱼种获得的生态毒性实验数据,对用于在遵从国际一致的标准化原则的前提下,科学地验证和评价稀有鮕鲫对化学品效应的稳定性和可重复性。做到了在使用中国特色鱼种的同时,遵循了国际通用的标准化验证研究过程,使稀有鮕鲫急性毒性实验对化学品的安全性评价更具说服力,同时也更易得到国际上的认可。

稀有鮕鲫作为一种具有潜力的生态毒性测试的生物种类,通过对鱼龄大小、暴露条件、方法等进行标准化的控制和固定,获得的急性毒性实验结果就有良好的稳定性和可重复性,适宜进行生态毒理学鱼类急性毒性实验的应用。但在实验动物标准化验证过程中,另有一些研究有待补充和完善,如稀有鮕鲫对化学品效应的敏感性、与国际通用鱼种数据间的可比性、鱼类慢性、长期实验数据的可靠性等。为能将稀有鮕鲫在生态毒理学中的推广应用,更多验证研究有待继续开展。

参 考 文 献

- [1] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 203: Fish, Acute Toxicity Test [S]. 1992.
- [2] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study [S]. 1984.

- [3] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 210; Fish, Early-Life Stage Toxicity Test [S]. 1992.
- [4] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 212; Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages [S]. 1998.
- [5] OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 215; Fish, Juvenile Growth Test [S]. 2000.
- [6] ISO Water quality-determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Part 1; Static method. Part 2; Semi-static method. Part 3; Flow-through method. Geneva; International Standardization Organization [S]. 1996.
- [7] Braunbeck, T, Böttcher, M, Hollert, H, et al. Towards an alternative for the acute fish LC test in chemical [M]. ALTEX 22 (2): 2005, 87 - 102.
- [8] EPA Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS850.1075; Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine [S]. 1996.
- [9] GB/T 21800-2008 化学品生物富集流水式鱼类试验 [S].
- [10] GB/T 21806-2008 化学品鱼类幼体生长试验 [S].
- [11] GB/T 21807-2008 化学品鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性试验 [S].
- [12] GB/T 21808-2008 化学品鱼类延长毒性 14 天试验 [S].
- [13] GB/T 21854-2008 化学品鱼类早期生活阶段毒性试验 [S].
- [14] GB/T 21858-2008 化学品生物富集半静态式鱼类试验 [S].
- [15] 叶妙荣, 傅天佑. 鱼丹亚科鱼类一新属新种记述(鲤形目:鲤科)[J]. 动物分类学报, 1983, 8(4):434 - 437.
- [16] 陈宜瑜(主编). 横断山区鱼类 [M]. 北京:科学出版社, 1998, 94 - 95.
- [17] 曹文宣, 王剑伟. 稀有鮡鲫一种新的鱼类实验动物 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(z1):96 - 97.
- [18] 朱晓鸣, 解绶启, 崔奕波, 等. 摄食水平和性别对稀有鮡鲫生长和能量收支的影响 [J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(3):240 - 247.
- [19] 王剑伟, 乔晔, 陶玉玲. 稀有鮡鲫仔鱼的摄食和耐饥饿能力 [J]. 水生生物学报, 1999, 23(6):648 - 654.
- [20] 王剑伟. 稀有鮡鲫的繁殖生物学 [J]. 水生生物学报, 1992, 16(2):165 - 174.
- [21] 常剑波, 王剑伟, 曹文宣. 稀有鮡鲫胚胎发育研究 [J]. 水生生物学报, 1995, 19(2):97 - 103.
- [22] 刘阿朋, 查金苗, 王子健, 等. 17 α -甲基睾酮对稀有鮡鲫幼鱼性腺发育与血清卵黄蛋白原水平的影响 [J]. 生态毒理学报, 2006, 1(3):254 - 258.
- [23] 姜福全, 王剑伟, 邵燕, 等. 东湖茶港排污口底泥对稀有鮡鲫的毒性 [J]. 水生生物学报, 2007, 31(6):829 - 835.
- [24] 周永欣, 成水平, 胡炜. 稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)七天亚慢性毒性试验 [J]. 环境科学学报, 1995, 15(3):375 - 380.
- [25] 廖涛, 金士威, 惠阳, 等. 城市污水处理厂进出水中类雌激素暴露影响评价 [J]. 环境化学, 2007, 26(6):819 - 822.
- [26] 国家环境保护总局. 新化学物质环境管理办法 [Z]. 北京, 2003.
- [27] Environment Canada. Environmental Protection Series, Biological Test Method: acute lethality test using rainbow trout [R]. 2007, Report EPS 1/RM/9.
- [28] 国家环境保护局. 203 化学品测试方法: 鱼类急性毒性试验 [S]. 北京, 2003.
- [29] 国家环境保护局. HJ/T 154-2004 新化学物质危害评估准则 [S]. 北京, 2004.
- [30] USEPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Environmental Monitoring and Support Laboratory [R]. 45268, 1985.
- [31] Chemicals Evaluation and Research Institute, Ministry of the Environment, Japan. Development of Test Methods and Suitability of Medaka as Test Organism for Detection of Endocrine Disrupting Chemicals [R]. 2003.

[收稿日期] 2013-10-18