ICS 65.120
B 46

中华人民共和国国家标准

GB/T 23388—2009

水产饲料安全性评价 残留和蓄积试验规程

Principle of aquafeed safety evaluation—Residue and cumulation test

2009-03-26 发布　　2009-07-01 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

前　言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:中国农业科学院饲料研究所、国家水产饲料安全评价基地。

本标准主要起草人:刘海燕、薛敏、吴秀峰、郑银桦。

水产饲料安全性评价 残留和蓄积试验规程

1 范围

本标准规定了水产饲料安全性评价残留和蓄积试验规程的基本技术要求。

本标准适用于水产动物使用的配合饲料、单一饲料及饲料添加剂的安全性评价，不包括饲料药物添加剂。

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。

GB/T 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法

GB 11607 渔业水质标准

GB 13078 饲料卫生标准

GB/T 22487 水产饲料安全性评价 急性毒性试验规程

GB/T 22488 水产饲料安全性评价 亚急性毒性试验规程

GB/T 23186 水产饲料安全性评价 慢性毒性试验规程

NY 5072 无公害食品 渔用配合饲料安全限量

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

靶器官 target organ

试验动物出现由受试物引起的明显毒性作用的任何器官。

3.2

残留 residue

动物接触受试物后，残存于动物体内的受试物及其在性质上和数量上有毒理学意义的代谢(或降解、转化)产物。

3.3

蓄积 cumulation

低于一次中毒剂量的受试物，反复与动物接触一段时间后致使机体出现的中毒反应。在本规程中是指动物反复多次从饲料中摄取、吸收、排出受试物的过程。当摄入大于排出时，受试物及其代谢产物就可能在机体内逐渐增加并蓄积，即蓄积生效；当摄入等于排出时，受试物及其代谢产物积累达到平衡；当摄入小于排出时，受试物及其代谢产物在动物体内减少并清除。

3.4

蓄积系数 bioaccumulation factor

BCF

动物从饲料中吸收受试物并在靶器官中积累毒物浓度达到动态平衡，生物体内的毒物浓度与饲料

中该毒物浓度的比值。

$$BCF = \frac{c_b}{c_f} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

c_b——稳态平衡时毒物浓度(高峰浓度)；

c_f——饲料中该毒物浓度。

3.5

吸收相　absorption duration

从开始摄入到受试物和(或)有毒代谢物在试验动物蓄积靶器官中蓄积生效的时间过程。

3.6

平衡相　counterbalance duration

受试物和(或)有毒代谢物在试验动物蓄积靶器官中蓄积达到稳态平衡浓度(高峰浓度)，并持续一定时间。

3.7

消除相　elimination duration

停喂期中，受试物和(或)有毒代谢物在试验动物蓄积靶器官中从稳态平衡浓度(高峰浓度)逐步消除至国际及国内相关标准规定的最高残留限量(maximum residule level，MRLs)所需要的时间。如受试物和(或)有毒代谢物尚无相关 MRLs 值，则以消除至高峰浓度的 1/10～1/20 所需要的时间为准。

3.8

时间-浓度曲线　time-concentration curve

C-t

受试物在试验动物体内是不断地吸收、分布、转化和排泄的，受试物和(或)有毒代谢物在试验动物蓄积靶器官中可能存在残留和蓄积作用。其浓度随着时间的推移也不断发生着变化，这种变化以蓄积浓度(C)为纵坐标，以时间(t)为横坐标绘出曲线图，称为时间-浓度曲线。包括吸收相、平衡相和消除相。

3.9

剂量-浓度曲线　dose-concentration curve

C-d

受试物和(或)有毒代谢物在试验动物蓄积靶器官中蓄积浓度随着饲喂剂量变化的规律，以蓄积浓度(C)为纵坐标，以剂量为横坐标绘出曲线图，称为剂量-浓度曲线。

3.10

半衰期　half life

$\frac{1}{2}t$

通常是指消除半衰期。即指受试物在试验动物蓄积靶器官中从高峰浓度下降一半所需的时间。

3.11

流水养殖系统　flow-through system

来自系统外的养殖用水连续或间歇地流经养殖容器的养殖系统。

4　原理

若受试物和(或)有毒代谢物(包括中间代谢产物、降解产物和其他结合物)在水产动物机体中产生残留或蓄积，并对水产动物、环境和人类食用安全造成潜在毒性，则应对试验水产动物肌肉、代谢器官(肝脏和肾脏)和其他蓄积靶器官中来源于受试物的有毒有害成分的残留物进行检测，揭示受试物和

(或)有毒代谢物在试验水产动物中的代谢和消解规律,为受试物的安全限量及停喂期的确定提供参考依据。

5 试验动物

选择依据 GB/T 22487 所筛选的对受试物敏感的水产动物作为试验动物,试验动物选用种属来源明确、健康、规格整齐的同批苗种。原则要同 GB/T 22488 和 GB/T 23186 一致。正式试验前应有 2 周的驯养期,驯养期内如果动物死亡率高于 10%,则淘汰该批苗种。驯养期结束后应淘汰由于驯养造成的质量差异的个体,保留健康活泼的水产动物继续作为试验动物。

6 剂量与分组

6.1 剂量设计参考的原则

6.1.1 原则上高剂量组的动物在饲喂受试物期间应当出现明显中毒反应,低剂量组不出现中毒反应。在此二剂量间再设 2 个及 2 个以上剂量组,以期获得比较明确的剂量-反应关系。对能或不能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物分别进行规定。

6.1.2 能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物:以经口服或注射 LD_{50} 的 10%～25%作为残留和蓄积毒性试验的最高剂量组,此 LD_{50} 百分比的选择主要参考 LD_{50} 剂量反应曲线的斜率。然后在此剂量下设几个剂量组,最低剂量组至少是试验水产动物可能摄入量的 3 倍。

6.1.3 对于不能求出经口或注射 LD_{50} 的受试物:残留和蓄积毒性试验应尽可能涵盖试验水产动物可能摄入量 100 倍的剂量组。对于试验水产动物摄入量较大的受试物,高剂量可以按在饲料中的最大掺入量进行设计。

6.2 分组

至少应设 4 个剂量组和一个对照组。受试物如果为配合饲料,首先明确目标毒性物质,直接饲喂,不设剂量组,需要另外设计对照组。每组不少于 6 个重复,每个重复的试验水产动物个体数量需依据吸收相、平衡相及消除相的预试验结果估算,但不能少于 50 个个体。

7 操作步骤

7.1 受试物的处理

将受试物粉碎至所要求的粒度(全部通过筛孔 0.28 mm 分样筛或更高细度),粒度的测定方法符合 GB/T 5917.1。根据受试物试验剂量的设计,把受试物添加到试验水产动物的配合饲料中,液体受试物按照试验剂量直接添加到其他原料的混合物中。充分混合,适当加工,制成营养组成、适口性、水稳定性、粒径等特性都符合试验目的和试验水产动物要求的试验饲料,减少受试物以外的因素对试验动物的影响。受试配合饲料直接饲喂。对某一种受试物进行评价时,要考虑到饲料配方中是否存在其他拮抗或协同作用的成分。在确定配方前分析相关原料常规营养成分,并分析其卫生指标,结果应符合 GB 13078和 NY 5072 标准。

7.2 受试物的给予

7.2.1 途径

用含有受试物的试验饲料或受试饲料喂养试验水产动物(应注意受试物在饲料中的稳定性)。当受试物添加到饲料中时,需将受试物剂量按每 100 g 试验水产动物体重的摄入量折算为饲料的量(mg/kg)。

7.2.2 试验动物空腹处理

试验水产动物在开始、中间取样及结束前应空腹 24 h。

7.3 试验周期

根据受试物在试验水产动物机体内吸收相、平衡相和消除相的时间确定。规定试验周期最长不超

过 24 周。

受试物和(或)有毒代谢物在试验水产动物蓄积靶器官残留或蓄积量达到稳态平衡浓度(3 次采样点浓度差异不显著)后,开始停喂期,即所有剂量组试验水产动物均投喂空白对照饲料,直至消除相结束。停喂期最长不超过 4 周。

7.4 试验条件

7.4.1 试验系统

为防止交叉污染,残留或蓄积性毒性试验要求使用流水养殖系统,养殖容器材料应无毒无害。废水排放要符合国家有关环保规定。

7.4.2 养殖条件

试验期间要保持养殖系统水温、流量、光照条件及养殖密度等条件处于试验水产动物最适生长要求范围。

7.4.3 水质条件

养殖过程中的水质应参照 GB 11607 的要求。

7.4.4 试验管理

正式试验开始时,应迅速将试验水产动物捞出、称重,此操作要快速而轻微,尽量减少对水产动物的刺激。

试验水产动物要定时定量或表观饱食投喂,详细记录投喂量及残饵量,测定饲料的溶失率以准确计算试验水产动物的摄食量。

每个取样点及试验结束时进行称重、取样。

7.5 取样

7.5.1 取样原则

对试验水产动物肌肉组织、代谢器官(血液、肝脏或肝胰腺和肾脏)和其他蓄积靶器官(如皮肤、脑和生殖器官等)中来源于受试物的残留物进行检测,取样前需对试验水产动物进行麻醉处理,麻醉剂的使用参见附录 A。

7.5.2 肌肉组织的取样

鱼去鳞、去皮,沿背鳍取肌肉;虾去头、去壳,取肌肉部分;蟹、鳖等去壳,取肌肉。将样品于−18 ℃以下冷冻保存备测。

7.5.3 代谢器官的取样

解剖试验水产动物,取肝脏或肝胰腺及肾脏等器官组织。样品于−18 ℃以下冷冻保存备测。

7.5.4 其他蓄积靶器官的取样

经确认的其他蓄积靶器官,如皮肤、脑和生殖器官等组织,样品于−18 ℃以下冷冻保存备测。

7.5.5 取样点

在给予受试物前应对受试水产动物取样,以此作为空白样品。为获得一个完整的浓度-时间曲线,取样点的设计应兼顾受试物及其有毒代谢物试验水产动物蓄积靶器官中的吸收相、平衡相(高峰浓度附近)和消除相。一般在吸收相内至少需要设置 2 个～3 个取样点,对于吸收快的受试物,应尽量避免第一个点是高峰浓度;在高峰浓度附近至少需要设置 3 个取样点;消除相内需要设置 3 个～4 个取样点。每个重复在每个取样点的动物数量至少 5 个以上。

为保证最佳取样点,建议在正式试验前,选择 10 个试验水产动物个体进行预试验,然后根据预试验的结果,审核并修正原设计的取样点。

8 残留分析

8.1 检测方法

采用针对受试物和(或)有毒代谢物确立的定性定量检测方法。

8.2 检测指标

检测组织中的受试物和(或)有毒代谢物的残留量,包括受试物中间代谢产物、降解产物或其他结合物的残留量,必要时确定受试物有效组分可能的代谢产物和代谢、消解规律。确定时间-浓度曲线和剂量-浓度曲线,并计算蓄积系数和半衰期。

9 数据处理

试验设计时即应选择适当的统计学方法,所有观察到的结果都应进行统计学分析和评价。完整、准确地描述对照组与各剂量组试验水产动物间各项指标的差异。

10 试验报告

结合生长、摄食及组织中的残留和蓄积结果,给出试验期内摄食一定量受试物后的主要的蓄积靶器官、蓄积过程及其代谢规律,包括时间-浓度曲线、剂量-浓度曲线、蓄积系数和半衰期。获得受试物和(或)有毒代谢物在试验水产动物机体中的代谢和消解规律。为受试物的安全限量及停喂期的确定提供判定依据。

24 周受试物和(或)有毒代谢物在试验水产动物机体中残留和蓄积量仍未达到平衡相,或停喂 4 周仍未达到最高残留限量(MRLs)的受试物,判定为不安全。

附 录 A
（资料性附录）
残留和蓄积试验常用麻醉剂及使用剂量

残留和蓄积试验常用麻醉剂及使用剂量见表 A.1。

表 A.1 残留和蓄积试验中常用麻醉剂及使用剂量表

名称和化学式	别 名	性 状	使用浓度	作用时间
三卡因 tricaine methanesulphonate $C_{10}H_{15}NO_5S$	鱼保安 MS222 Finquel-™	白色微细结晶粉末，易溶于水	25 mg/L～300 mg/L	1 min～3 min
丁香酚 euqgenol 2-甲氧-4 丙烯基酚	AQUI-S	无色至淡黄色液体，在空气中变棕色，有强烈的丁香气味。极易溶于水，溶于乙醇、乙醚、三氯甲烷和精油。	25 mg/L～100 mg/L	40 s～1 min
三氯叔丁醇 chloroeutanol $C_4H_7C_{13}O \cdot 0.5H_2O$	—	白色微细结晶粉末，易溶于有机溶剂	100 mg/L～1 200 mg/L	20 s～1 min