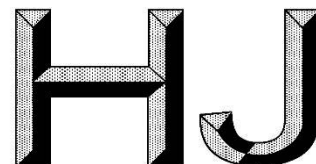


附件 2



中华人民共和国国家生态环境标准

HJ □□□□—20□□

难测试化学物质水生毒性测试 技术指南

Technical guidance for aquatic toxicity testing of difficult test chemicals

(征求意见稿)

202□-□□-□□发布

202□-□□-□□实施

生态环境部 发布

目 次

前 言	ii
1 适用范围	3
2 规范性引用文件	3
3 术语和定义	3
4 总体测试程序	4
5 难测试属性识别	4
6 测试方法改进	6
7 暴露浓度分析和毒性结果表征	13
附录 A（资料性附录）难溶受试物受试溶液配制方法	15
附录 B（资料性附录）暴露系统的选择与流水式暴露系统	17
附录 C（资料性附录）时间加权平均浓度的计算方法	19

前 言

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》和《新化学物质环境管理登记办法》，保障人体健康，保护生态环境，规范难测试化学物质水生毒性测试，以维持稳定暴露浓度、准确表征毒性测试结果，制定本标准。

本标准规定了对具有难测试属性的化学物质开展水生毒性测试时，对难测试属性识别、测试方法改进、暴露浓度分析和毒性结果表征的技术要求。

本标准的附录 A～附录 C 为资料性附录。

本标准为首次发布。

本标准由生态环境部固体废物与化学品司、法规与标准司组织制定。

本标准主要起草单位：生态环境部南京环境科学研究所、生态环境部固体废物与化学品管理技术中心。

本标准由生态环境部 202□年□□月□□日批准。

本标准自 202□年□□月□□日起实施。

本标准由生态环境部解释。

难测试化学物质水生毒性测试技术指南

1 适用范围

本标准规定了对具有难测试属性的化学物质开展水生毒性测试时，对难测试属性识别、测试方法改进、暴露浓度分析和毒性结果表征的技术要求，是 HJ/T 153 涉及的水生毒性测试方法的补充。

本标准适用于难测试化学物质的水生毒性测试，包括藻类、溞类以及鱼类等水生生物以稀释水或液态培养基为暴露介质开展的急慢性毒性测试。

2 规范性引用文件

本标准引用了下列文件或其中的条款。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本标准。凡是未注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

HJ/T 153	化学品测试导则
HJ 1257	化学物质环境管理 化学物质测试术语
HJ 1357	化学物质环境管理命名规范

3 术语和定义

HJ 1257 以及 HJ 1357 界定的以及下列术语和定义适用于本标准。

3.1

难测试化学物质 difficult test chemicals

测试中难以通过常规标准化方法进行测试的化学物质。主要表现为常规处理方式不适用等，可通过对标准测试方法做出部分修改或补充后获得有效的测试结果。本标准中的难测试化学物质特指具有难溶、易挥发、易降解、强吸附、络合性、有色、疏水性、离子化、多成分及成分不明复杂等难测试属性的化学物质。

3.2

稳定暴露浓度 stable exposure concentration

在整个测试期间，暴露浓度可维持在配制浓度或实测浓度平均值80%~120%范围内时，该暴露浓度称为稳定暴露浓度，可使用配制浓度或实测浓度的几何平均值表示。

3.3

试验介质 test medium

构成暴露系统环境的、不含受试物或溶剂的稀释水或培养基。

3.4

临界胶束浓度 critical micelle concentration

表面活性剂在溶液中从单个分子或离子状态缔合形成胶态聚集物的最低浓度。

3.5

溶解态浓度 dissolved concentration

通过孔径为0.45 μm的滤膜过滤后液体中的受试物含量，或经4000 g（或40000 m/s²）转速离心15 min后上清液中的受试物含量。

4 总体测试程序

首先识别受试物的难测试属性，据此对HJ/T 153测试方法中测试对象选择、受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存等过程进行必要的改进，适用时还需对暴露浓度分析和毒性结果表征方法进行改进。对于同时具有多个难测试属性的受试物，需兼顾各种难测试属性的改进要求。总体测试程序详见图1。

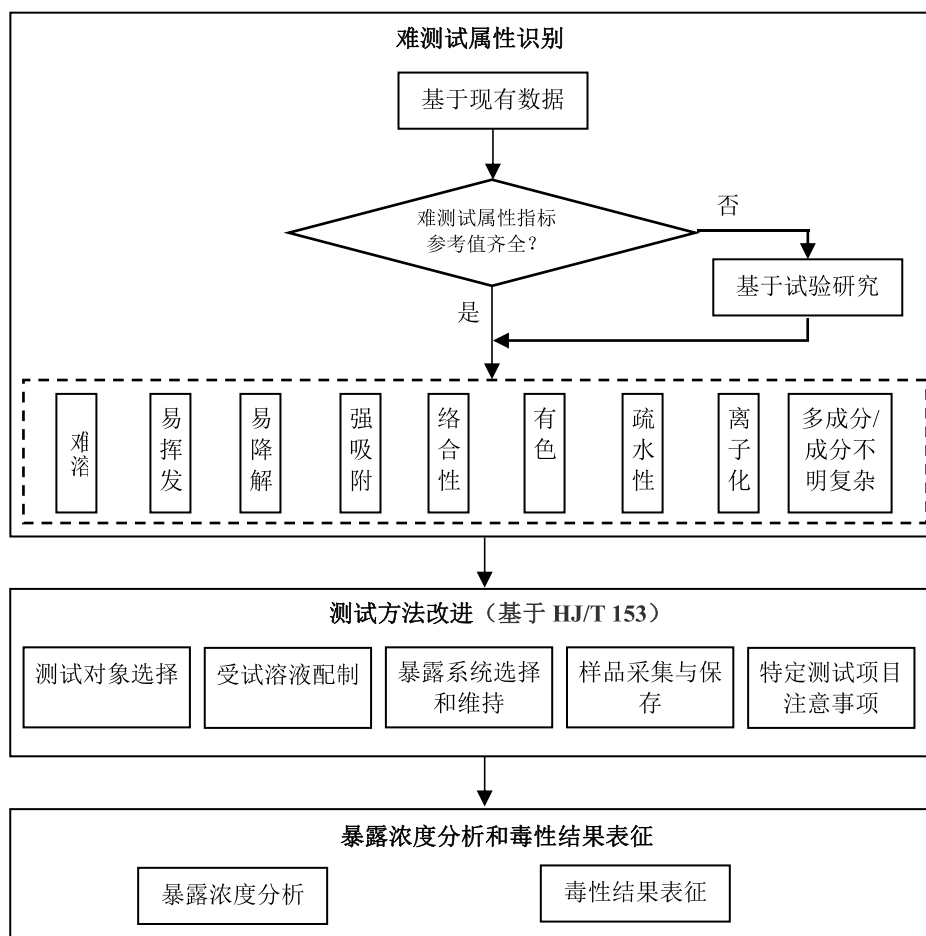


图 1 总体测试程序

5 难测试属性识别

5.1 基于现有数据的难测试属性识别

可根据受试物的物理化学性质、降解性等数据，参照表 1 识别其难测试属性。

表1 难测试属性指标参考值

难测试属性	评估指标	参考值	
难溶	水溶解度 (20 °C)	<100 mg/L	
易挥发	亨利常数 (H)	>0.1 Pa·m ³ /mol	
易降解	易光解	光解半衰期 (25 °C)	
	易水解	水解半衰期 (25 °C, pH 5~9)	
	易氧化	分子结构	遇到氧气易发生化学反应的物质, 如不饱和脂肪酸、乙烯基类化合物、醇类等
	易生物降解	最终/初级好氧生物降解时间	<水生毒性测试周期
强吸附	吸附系数 (K _{oc})	logK _{oc} ≥3	
络合性	分子结构	含有可能与试验介质发生络合作用的中心离子或配位基团	
有色	颜色或分子结构	可见光下目测有颜色, 或含有发色基团和助色基团	
疏水性	鱼类生物富集系数 (BCF) 或正辛醇-水分配系数 (K _{ow})	BCF>1000 或 K _{ow} >10000	
离子化	logD (分子态和离子态正辛醇-水分配系数) 最大值对应的 pH 值	4~10	
多成分	参见 HJ 1357 “多成分物质” 定义		
成分不明复杂	参见 HJ 1357 “不明复杂物质” 定义		

5.2 基于试验研究的难测试属性识别

对于难溶、疏水性、有色、易挥发、强吸附和易降解（除氧化外）等难测试属性，现有数据不足以识别的，可参照表 2 通过开展试验研究进行识别。

表 2 基于试验研究的难测试属性识别方法

难测试属性	试验研究方法	识别方法
难溶	配制100 mg/L的受试溶液，充分搅拌 (≥24 h)，具体参见HJ/T 153 测试方法中水溶解度试验烧瓶法。	肉眼或显微镜观察存在不溶物。
疏水性		固体受试物，配制过程中观察到水滴凝聚现象；液体受试物，观察到不溶部分明显与水分层。
有色		肉眼观测到水溶部分显色。
易挥发	相同受试溶液置于开放容器与密闭容器中，在测试条件下放置一段时间后，测定受试物的损耗。	水生毒性测试周期内观测到受试物在开放容器中的损耗显著高于在密闭容器中的损耗。
强吸附	相同受试溶液置于两个相同容器中，其中一个用受试溶液充分预洗。在测试条件下放置一段时间后，测定受试物的损耗。	水生毒性测试周期内观测到受试物在未预洗容器中的损耗显著高于在预洗容器中的损耗。
易降解（除氧化外）	相同受试溶液置于充分预洗的两个相同密闭容器中，在测试条件下分别于光照和避光条件下放置一段时间，测定受试物的损耗。	若水生毒性测试周期内观测到受试物在两个容器中的损耗明显，说明易降解。若在光照容器中的损耗显著高于在避光容器中的损耗，说明存在光解；若在两个容器中的损耗相当，说明存在生物降解、水解等降解转化情况。

6 测试方法改进

6.1 难溶受试物

6.1.1 一般要求

因难溶受试物的水溶解度低于或接近试验浓度,常规方法难以保证受试溶液的均质性或因溶解度过低而难以开展定量检测。需从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存等过程进行改进。

6.1.2 受试溶液配制

难溶受试物的受试溶液配制可从以下方面改进:

a) 可采用促溶的直接添加法、助溶剂法、发生器法、悬浊液和乳浊液法等改进受试溶液配制, 详见附录A。

b) 除悬浊液和乳浊液外, 受试溶液中应避免出现肉眼可见的未溶解的受试物。可采用以下方法分离去除未溶物:

1) 离心法, 即受试溶液在 $100000\text{ m/s}^2\sim 400000\text{ m/s}^2$ (约 $10200\text{ g}\sim 40800\text{ g}$)下离心 30 min 。

2) 膜过滤法, 即使用滤膜(孔径一般为 $0.22\text{ }\mu\text{m}\sim 0.45\text{ }\mu\text{m}$)过滤。过滤器应为惰性材质, 且使用前应使用超纯水或受试溶液预洗。

c) 对于表面活性剂类受试物, 配制浓度应低于临界胶束浓度, 以确保受试生物暴露于自由溶解的受试物而不是胶束态的受试物。

d) 可通过激光照射溶液观察丁达尔效应, 以检验分离有效性及胶束的形成情况。

e) 对于气态受试物, 应配制接近试验条件下饱和浓度的受试溶液。可在盛有试验介质的容器中通入超过饱和溶解量的受试物并密闭, 室温下慢速搅拌或振摇至少 48 h 并检测不同时间的受试物浓度, 确保达到溶解平衡。

6.1.3 暴露系统选择和维持

难溶受试物的暴露系统选择和维持可从以下方面改进:

a) 受试溶液配制方法为助溶剂法时, 应符合以下要求:

1) 一般应设置空白对照组和不加受试物但加入等量助溶剂的对照组, 对涉及动物福利的试验, 可只设置后者。

2) 以丙酮、甲醇、乙醇为助溶剂时, 应关注溶解氧的变化, 避免这类助溶剂因促进微生物快速生长而消耗氧气。必要时通过曝气等方式增氧, 确保溶解氧符合相关测试方法的要求。

3) 兼具易挥发属性的受试物确需使用丙酮、甲醇、乙醇、叔丁醇、三甘醇等易挥发助溶剂时, 应选择密闭系统开展测试。

b) 受试溶液配制方法为发生器法时, 对于需在测试前挥发除尽溶剂的情形, 应设置不加受试物但经过相同处理过程的对照组, 以排除溶剂残留的影响。

c) 受试溶液配制方法为悬浊液和乳浊液法时, 应评估未溶解受试物对受试生物造成的

卡阻、缠绕等物理影响。若物理影响显著，应使用筛网等装置将未溶解的受试物与受试生物隔开。

6.1.4 样品采集与保存

采集试验容器中的全部样品或从高、中、低三个不同位置取等量样品后混样。

6.2 易挥发受试物

6.2.1 一般要求

受试溶液配制、染毒暴露、样品采集与保存等过程可能导致易挥发受试物逸散损失，从而造成实际浓度偏离配制浓度或在测试周期内不稳定、实测浓度定量不准等问题。需从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存等过程进行改进。

6.2.2 受试溶液配制

应减少配制容器液面顶部空间或保持溶液充满容器（零顶空），配制过程应低温。必要时可采用注射器转移溶液，减少挥发损失。

兼具难溶性的受试物，采用助溶剂法配制溶液时，不宜选择丙酮、甲醇、乙醇、叔丁醇、三甘醇等易挥发助溶剂，避免受试物与助溶剂同时挥发造成试验浓度降低；采用发生器法配制溶液时，只能通过洗涤去除助溶剂。

6.2.3 暴露系统选择和维持

选择适宜的静态、半静态暴露系统，以最大程度地维持稳定暴露浓度，具体可参见附录B。同时保持试验容器密闭并减少液面顶部空间或保持零顶空。

使用非常规暴露系统时（如零顶空暴露系统、调整培养基组分等），应在相同条件下开展参比物试验，以确认相关调整不影响受试生物毒性敏感性。

6.2.4 样品采集与保存

采集受试溶液应装满样品瓶（零顶空），并于24h内处理分析。

6.2.5 特定测试项目注意事项

对于易挥发受试物的特定测试项目，还可从以下方面改进：

a) 藻类毒性试验中，一般采用静态暴露系统。使用密闭容器开展试验时，应降低初始藻细胞浓度，并向培养基中补充添加碳酸氢钠，以满足藻类生长所需的充足碳源。

b) 溞类繁殖毒性试验中，移除幼溞与更新受试溶液应同时进行，以减少试验容器打开的次数。

c) 鱼类毒性试验中，在液面顶部空间少或零顶空条件下，应在方法允许范围内选择体长较小的鱼、较大的受试溶液体积，或增加受试溶液更新频率，以满足鱼类对溶解氧的需求。

6.3 易降解受试物

6.3.1 一般要求

易降解受试物母体与其降解产物的毒性可能存在显著差异，若不区分测试对象，可能造成测试结果偏离。同时，易降解受试物在受试溶液配制、染毒暴露、样品采集与保存过程中可能会因光解、水解、氧化或生物降解而损失，造成实际浓度偏离配制浓度或在测试周期内不稳定、实测浓度定量不准等问题。需合理选择测试对象并从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存等过程进行改进。

6.3.2 测试对象选择

易降解受试物的水生毒性测试对象选择，应基于受试物母体及其降解产物的水生毒性预试验或者定量结构活性关系（QSAR）预测结果，并应符合以下原则：

a) 受试物母体及其降解产物在限度试验浓度范围内均未观测到毒性效应时，一般以测试条件下母体或其降解产物中相对更稳定的一种物质形态作为测试对象，否则应说明合理性或必要性。相对稳定性可根据二者维持稳定暴露浓度的时间确定。

b) 受试物母体或其降解产物在限度试验浓度范围内观测到毒性效应时，宜分别以母体和其降解产物开展毒性测试，或者至少应选择测试条件下母体或其降解产物中毒性较高的一种物质形态开展测试。

6.3.3 受试溶液配制

6.3.3.1 通用要求

易降解受试物受试溶液配制方法改进时的通用要求包括：

a) 测试对象为受试物母体时，应缩短受试溶液的配制时间。兼具难溶性的受试物，不宜采用发生器法配制溶液。

b) 测试对象为降解产物时，可在测试前将受试物母体贮备液或受试溶液放置6倍半衰期或更长时间，以提高受试溶液中降解产物含量。测试前，应将受试溶液pH值调至与对照组相同。

6.3.3.2 易水解受试物

易水解受试物受试溶液配制方法改进时应符合以下要求：

a) 测试对象为受试物母体时，避免使用水基贮备液。

b) 测试对象为水解产物且产物易形成聚合物时，应缓慢地将受试物加入到试验介质中并快速搅拌，避免形成局部高浓度的聚合物。随后补充试验介质到所需体积，并持续搅拌一段时间，以确保充分水解。

6.3.3.3 其他情形

易光解受试物溶液应避光配制和保存；易氧化受试物和易生物降解受试物贮备液应在缺氧（如充氮气或零顶空）条件下保存；应少用或避免使用有机溶剂配制易生物降解受试物贮备液。

6.3.4 暴露系统选择和维持

6.3.4.1 易光解受试物

采用流水式暴露系统时，贮备液应避光存储，贮备液分配至试验容器的管线应为不透光材质（如聚四氟乙烯内衬软管、不锈钢管等），流速设置应综合考虑受试物的光解损失和对受试生物的影响。

6.3.4.2 易水解受试物

在方法允许的范围内，选择合适的温度和pH值，使测试对象最大程度地维持稳定暴露浓度。

6.3.4.3 易氧化受试物

试验过程中的氧化作用无法避免，但应避免氧化耗氧作用对受试生物的影响。可通过向受试溶液中通气、增加受试溶液的体积、降低受试生物承载率或增加溶液更新频率等方法维持溶解氧浓度。

6.3.4.4 易生物降解受试物

选择适宜的半静态或流水式暴露系统，以减少受试物母体降解损失对测试结果的影响，具体可参见附录B。半静态系统更新溶液时应确保旧受试溶液更新比例最大化。宜使用3%~5%高锰酸钾溶液对试验容器进行灭菌处理，避免使用抗生素灭菌，必须使用时应说明理由，并增设使用抗生素的对照组。

6.3.5 样品采集与保存

易降解受试物测试样品采集后应在24 h内完成前处理和分析，减少样品在储存过程中的损失。同时，易光解受试物测试样品应避光保存，如使用棕色瓶存储或用锡箔纸包裹；易水解受试物测试样品应在有机溶剂中保存；易氧化受试物测试样品应在缺氧（充氮气或零顶空）条件下保存；易生物降解受试物测试样品需对贮存容器做灭菌处理，在缺氧（充氮气或零顶空）条件下保存。

6.3.6 特定测试项目注意事项

对于以受试物母体为测试对象的易光解受试物，还应符合以下要求：

a) 鱼类和溞类的短期急性毒性试验可在黑暗条件或避开能导致光解的光波长开展；对于长期慢性试验，可选择避开能导致光解的光波长开展试验，不宜在完全黑暗的环境中进行试验。

b) 导致受试物光解的波长不在藻类光合作用的波长范围（400 nm~700 nm）内或部分重叠时，藻类毒性试验可选择性滤除导致光解的波长，降低光解损耗。

6.4 强吸附受试物

6.4.1 一般要求

强吸附受试物易在试验容器壁和/或受试生物饲料表面发生吸附，导致受试溶液实际浓度偏离配制浓度，由此导致试验误差。需对受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存等过程进行改进。

6.4.2 受试溶液配制

受试溶液配制过程中避免使用膜过滤法分离未溶解物，同时减少容器转移操作，以减少受试物吸附损失。

6.4.3 暴露系统选择和维持

宜使用半静态或流水式暴露系统来代替静态暴露系统，以提高受试溶液的更新速率或频率，具体可参见附录B。

试验容器应使用低吸附性材料（如聚四氟乙烯），避免使用强吸附性材料（如橡胶、聚乙烯）；对于金属类受试物，宜使用塑料、聚丙烯材质或硼硅酸盐玻璃容器，不宜使用硅酸钠玻璃容器。同时宜选择受试溶液与容器壁接触面积较小的试验容器，并应在测试前采用受试溶液进行表面预饱和和处理。

试验介质的溶解性有机碳浓度一般应 ≤ 2 mg/L。

6.4.4 样品采集与保存

采集试验容器中的全部样品或从高、中、低三个不同位置取等量样品后混样。采样容器宜与水不互溶的溶剂（如正己烷）预洗，以降低受试物在采样容器内壁的吸附损失。

6.4.5 特定测试项目注意事项

强吸附受试物的水生毒性特定测试项目，还应符合以下要求：

a) 藻类毒性试验中，宜降低初始接种藻细胞浓度和/或减少试验时间。为确认藻类的生物吸附作用，可从受试溶液样品中去除藻类后单独采样分析，或设置不加藻的对照组。

b) 需要饲喂的暴露系统中，喂食后应及时清除过量的食物和碎屑；若遇受试溶液更新，则应在溶液更新前喂食并预留摄食时间（如鱼类30 min，溞类2 h）。

6.5 络合性受试物

6.5.1 一般要求

对于试验介质中含有腐殖质、乙二胺四乙酸（EDTA）等配位基团的测试项目，络合性受试物中所含中心离子可能与这些配位基团结合形成络合物，从而降低受试物的生物可利用性。同时，对于试验介质中含有微量元素等中心离子的测试项目，络合性受试物中的脂肪氨基、芳香氨基等配位基团可能与中心离子结合形成络合物，降低微量元素的生物可利用性，从而对受试生物的生长产生影响。为避免络合作用造成受试物固有毒性测试结果的偏离，需对受试溶液配制、暴露系统选择和维持等过程进行改进。

6.5.2 受试溶液配制

对于含有中心离子或配位基团的受试物，应避免使用含有可配位结合组分的试验介质，或降低可配位结合组分的浓度。如对于含有金属离子的受试物，开展大型溞毒性试验时用标准稀释水替代含有EDTA的Elendt M4和Elendt M7培养基。

6.5.3 暴露系统选择和维持

若在HJ/T 153各测试方法基础上改用不含可配位结合组分的试验介质或降低可配位结合组分的浓度,应同时开展参比物试验,以确认试验介质的调整不影响受试生物毒性敏感性。

络合性受试物的暴露系统应明确试验介质中溶解性有机碳、硬度、pH值等影响受试物生物可利用性和毒性的水质参数,以确定水生毒性测试结果对应的水质条件。

6.6 有色受试物

6.6.1 一般要求

有色受试物对特定波长光照能量的吸收可能干扰光照条件,影响藻类、溞类生长,导致测试结果不能反映受试物固有毒性。高浓度有色受试溶液的遮蔽效应也给水生生物形态、数量的观测造成困难。需针对特定测试项目改进光照条件或者观测方法。

6.6.2 特定测试项目注意事项

有色受试物水生毒性的特定测试项目可从以下方面改进:

a) 藻类毒性试验中,应提高光照强度($>120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$)、提高振摇速度、缩短光通路或减少受试溶液体积;藻细胞计数不宜使用光度计法。

b) 溞类毒性试验中,为便于观测毒性效应,可增加观测背景亮度(如将试验容器放在灯箱上),或将受试溶液转入开口大、液面浅的容器中进行观察。

c) 鱼类毒性试验中,可将受试生物转移到不含受试物的试验介质中观察。

6.7 疏水性受试物

6.7.1 一般要求

疏水性受试物在暴露过程中的析出或聚集可能导致局部暴露浓度升高,受试生物可能因受试物颗粒或油膜的卡阻、缠绕等作用产生物理损伤,从而导致测试结果偏离受试物固有毒性,需对受试溶液配制、暴露系统选择和维持等过程进行改进。同时,因具有较大的Kow,疏水性受试物一般还兼有难溶、强吸附的难测试属性,试验设计时需一并考虑。

6.7.2 受试溶液配制

参见难溶受试物受试溶液配制过程的改进方法(6.1.2)。

6.7.3 暴露系统选择和维持

暴露过程中应去除漂浮的受试物膜,或采用筛网等装置防止受试生物接触受试物膜。对于活动抑制的受试生物,应用显微镜检查其体表的受试物附着情况。

6.8 离子化受试物

6.8.1 一般要求

受试溶液pH值的微小改变可打破离子化受试物离子态和分子态之间的平衡,进而影响

受试物的水溶解度、分配系数以及生物可利用性，对毒性结果产生显著影响。需对受试溶液配制过程进行改进，确保测试结果能反映受试物毒性的最大值。

6.8.2 受试溶液配制

6.8.2.1 确定测试pH值条件

离子化受试物的受试溶液配制应先采用以下方法确定测试pH值条件：

a) 受试物的pKa值已知时，可通过公式（1）计算受试溶液平衡时的受试物离子化分数 α 。在受试生物的pH耐受范围（一般为6~9，具体参照HJ/T 153各测试方法）内，宜分别选择受试物以分子态为主（ $\alpha < 0.5$ ）和以离子态为主（ $\alpha > 0.5$ ）的pH值作为测试pH值条件开展测试，或者至少应选择受试物以毒性较高的一种物质形态（分子态或离子态）为主的pH值开展测试。

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{A(pH - pKa)}} \quad (1)$$

式中： α ——离子化分数；

A ——酸碱系数。当受试物为酸时， $A=+1$ ；当受试物为碱时， $A=-1$ 。

b) 受试物在不同pH值条件下的log D曲线已知时，选择受试生物pH耐受范围（一般为6~9，具体参照HJ/T 153各测试方法）内最大的log D值对应的pH值作为测试pH值条件。

c) 受试物的pKa和不同pH值条件下的log D曲线均已知时，分别按a)和b)确定测试pH值条件。

6.8.2.2 受试溶液pH值调整

受试溶液需使用酸、碱或缓冲液将pH值调至预试验确定的测试pH值条件，但应避免使用可与受试物发生反应（如沉淀、降解或络合）的缓冲液。

6.8.3 特定测试项目注意事项

藻类毒性试验中，可通过降低初始藻细胞浓度、增加培养基中碳酸氢钠浓度的方式降低藻类生长消耗 HCO_3^- 的影响，减少pH值偏移。同时开展参比物试验，以确认藻类毒性敏感性。

6.9 多成分物质及不明复杂物质

6.9.1 一般要求

多成分物质及不明复杂物质的多个成分理化性质存在差异，各成分在暴露体系中赋存状态不尽相同，从而可能导致采集的受试溶液样品缺乏代表性。需对受试溶液配制、样品采集与保存等过程进行改进。

6.9.2 受试溶液配制

多成分物质及不明复杂物质不宜采用助溶剂助溶，其主要成分具有难溶性的，可采用水载荷组分（WAFs）法、水溶性组分（WSFs）法或不添加助溶剂的被动加标法配制受试溶液。WAFs/WSFs法的注意事项包括：

a) 不同浓度的WAFs/WSFs一般应单独制备，不能采用母液稀释。仅当受天平最小称量

限制而无法单独制备低浓度WAFs/WSFs时，可以采用母液连续稀释法配制，但应在测试报告中说明原因。

b) WAFs/WSFs配制时间及混匀强度应通过预试验确定，确保达到最大平衡浓度，且WAFs的组成和粒度相对稳定。一般采用慢速搅拌法，使溶液表面形成小“涡旋”（涡旋高度一般不超过液面高度的10%），在48 h内可达到平衡。

c) 若基于WAFs的测试结果表明受试生物受到未溶解成分造成的物理损伤，应改用WSFs或采用筛网等装置防止受试生物接触未溶解成分。

6.9.3 样品采集与保存

采集试验容器中的全部样品或从高、中、低三个不同位置取等量样品后混样。

7 暴露浓度分析和毒性结果表征

7.1 暴露浓度分析

7.1.1 分析方法

难测试化学物质可能因在受试溶液中浓度过低导致难以精准检测。样品分析时，应优先采用色谱法、光谱法、色谱-质谱联用法以及电感耦合等离子体质谱法等特定化学分析方法对受试物进行定性和/或定量检测。特定化学分析方法不适用时，可检测总有机碳（TOC）等综合性指标，并给出使用该综合性指标的必要性和方法有效性。

需采用流水式暴露系统的难测试化学物质，其暴露浓度分析还应考虑附录B.2.4相关注意事项。

7.1.2 实测浓度表征

实测浓度的表征应符合以下要求：

a) 对测试方法进行改进后仍不能维持稳定暴露浓度时，采用静态暴露系统的，暴露浓度应以实测浓度的几何平均值表示；采用半静态以及流水式暴露系统的，暴露浓度应以时间加权平均浓度表示。计算方法见附录C。

b) 采用特定化学分析方法定量暴露浓度时，若样品中受试物浓度高于检出限但低于定量限，应取1/2定量限作为实测浓度；若受试物浓度低于检出限，可取检出限作为实测浓度。为了验证受试物稳定性，可分析贮备液或者高浓度受试溶液中受试物浓度变化，以该浓度变化情况作为受试物在测试条件下维持稳定暴露浓度的支撑数据。

c) 采用TOC等综合性指标方法表征暴露浓度时，若综合性指标检出值 ≥ 3 倍空白值，应采用综合性指标折算受试物浓度；否则，应采用配制浓度或者承载率来表征暴露浓度，综合性指标值的变化只用于表征受试物在测试条件下稳定性的变化。

7.2 毒性结果表征

受试物毒性结果的表征应符合以下要求：

a) 单成分物质的毒性结果一般以溶解态受试物浓度表征；适用时还应符合以下要求：

1) 若单成分物质属于表面活性剂、带电聚合物和脂肪胺等自分散性物质，暴露浓度应

以分散在受试溶液中的全部受试物浓度表征。

2) 基于悬浊液或乳浊液法的毒性效应浓度应采用最大分散浓度或临界胶束浓度表征。

b) 多成分物质及不明复杂物质的毒性结果一般以各主要成分（含量>10%）的浓度表征；适用时还应符合以下要求：

1) 成分未知、可变或缺少有效检测方法时，可用其中一种或几种可识别组分浓度表征；

2) 当有证据表明受试物中某种杂质的水生毒性可能较高，且其含量在一定变化范围内（<10%）时，应同时给出该杂质的实测浓度。

附录 A

(资料性附录)

难溶受试物受试溶液配制方法

A.1 直接添加法

直接添加法是称取定量受试物加入试验介质直接配制受试溶液的方法。难溶受试物可以进一步采用搅拌、超声、加热、调pH值等方法促溶后配制受试溶液。促溶方法应以受试物完全溶解为目标确定搅拌时间和强度，其注意事项包括：

a) 搅拌法。难以目测溶解情况的液体受试物一般在室温下至少搅拌24 h，且不能搅起“涡旋”，避免乳化。

b) 超声法。超声处理时间不宜超过30 min，以避免溶液升温导致受试物降解或形成意外的副产物。

c) 加热法。加热温度不应超过受试物以及试验介质的热分解温度。加热法配制的受试溶液须冷却到试验温度后才能启动试验。若受试溶液溶解氧因加热过程而降低，需在测试前通过曝气等方式增氧以确保符合相关测试方法的要求。

d) 调pH值法。通过调节pH值促溶后应检测溶液pH值，确保其符合相关测试方法的要求。若调节后受试溶液的pH值与受试生物保种介质的pH值相差超过1.5，则应将受试生物在调节后的受试溶液的pH值条件下驯养。

A.2 助溶剂法

助溶剂法是通过低毒、亲水性助溶剂将受试物引入试验介质获得受试溶液的方法。该方法适用于可溶于亲水性有机溶剂的难溶受试物，仅在无其他适合的配制方法时才使用。其注意事项包括：

a) 可选的助溶剂包括丙酮、二甲亚砜、二甲基甲酰胺、甲醇、乙醇、叔丁醇、三甘醇以及乙腈等。

b) 应确保助溶剂对照组和处理组中助溶剂浓度相同且比该助溶剂的无可观察效应浓度（NOEC）低一个数量级，一般低于100 mg/L（或0.1 mL/L）。对于内分泌干扰物筛选试验和鱼类繁殖试验，助溶剂浓度应不超过0.02 mL/L。

A.3 发生器法

发生器法包括饱和柱法、固液饱和法和被动加标法。

a) 饱和柱法是以涂有过量受试物的惰性载体为填充材料制作填充柱，用试验介质循环洗脱并达到平衡后，以洗脱液为受试溶液的方法。该方法适用于可溶于易挥发有机溶剂的难溶受试物。其注意事项包括：

1) 在涂布之前，应通过冲洗或热解处理确保载体上没有残留物。试验前，在载体上均匀涂布受试物并挥发除尽溶剂。

2) 受试溶液的平衡浓度应通过化学分析确定。

3) 可通过调节饱和柱体积、载体中受试物涂布量来配制不同浓度的受试溶液。

b) 固液饱和法是将受试物溶解于易挥发有机溶剂并均匀涂布在试验容器内壁，挥发除去溶剂后，将试验介质加入容器中充分接触，直至受试物进入溶液而配制受试溶液的方法。

法。该方法适用于固态、可溶于易挥发有机溶剂的难溶受试物。使用该方法时，应避免搅拌过程中物理性地破坏受试物涂层（如使用搅拌棒）。

c) 被动加标法是将装载受试物的惰性载体置于试验容器中，通过载体和试验介质之间的分配平衡来配制受试溶液的方法。必要时可采用搅拌等方法加速分配。该方法适用于 $K_{ow} > 1000$ 的难溶受试物。其注意事项包括：

1) 载体应为食品级、医疗级或分析级材质，以减少杂质浸出。常用的载体材料包括聚硅酸四乙酯、有机硅等。

2) 为缩短平衡分配时间、增加受试物装载容量，可选择表面积大、体积大的环状和棒状载体。

3) 根据受试物特性和试验浓度选择适宜的受试物装载方法：

——一般将载体浸入受试物的悬/乳浊液或有机溶剂溶液中，达到分配平衡后即完成装载；使用本方法须在投入试验介质前去除助溶剂。

——对于液态受试物，可以将载体直接浸入液体受试物中，吸附饱和后即完成装载。

——也可以将受试物悬/乳浊液或液体受试物直接注射至薄壁、小内径的多孔管状载体（如壁厚 $9.5\ \mu\text{m}$ 、内径 $1.5\ \text{mm}$ 的硅胶管）中进行装载。

4) 通过改变试验介质体积或者载体中受试物装载量来配制不同浓度的受试溶液。

A.4 悬浊液和乳浊液法

悬浊液法是将固体难溶受试物加入试验介质并充分混匀，以形成的悬浊液进行试验的方法。乳浊液法是将液体难溶受试物加入试验介质并充分混匀，以形成的乳浊液进行试验的方法。本方法仅适用于用作分散剂、乳化剂、表面活性剂或以悬浊液和乳浊液形式存在的化学物质。

附录 B

(资料性附录)

暴露系统的选择与流水式暴露系统

B.1 暴露系统的选择方法

一般优先采用静态暴露系统，不能维持稳定暴露浓度时，视情况采用半静态暴露系统以及流水式暴露系统，参见表 B.1。

表 B.1 暴露系统的选择方法

暴露系统		受试溶液更新方式	适用情形
静态		不更新	1) 在测试周期内不更新受试溶液就可以维持稳定暴露浓度； 2) 采用半静态与流水式系统会导致受试生物损失或其他损伤（如溶液更新会导致藻类损失）。
半静态		定期分次更新	采用静态暴露系统不能在测试周期内维持稳定暴露浓度，但在 1 次/24 h 及更低溶液更新频率下能在测试周期内维持稳定暴露浓度。
流水式	间歇流水式	以固定频率间歇流动更新	半静态暴露系统在 1 次/24 h 及更低溶液更新频率下仍不能在测试周期内维持稳定暴露浓度。
	连续流水式	连续流动更新	

B.2 流水式暴露系统

B.2.1 流水式暴露系统用于水生毒性测试，可以保持试验介质的水质，维持稳定暴露浓度。流水式暴露系统的示意图见图 B.1。

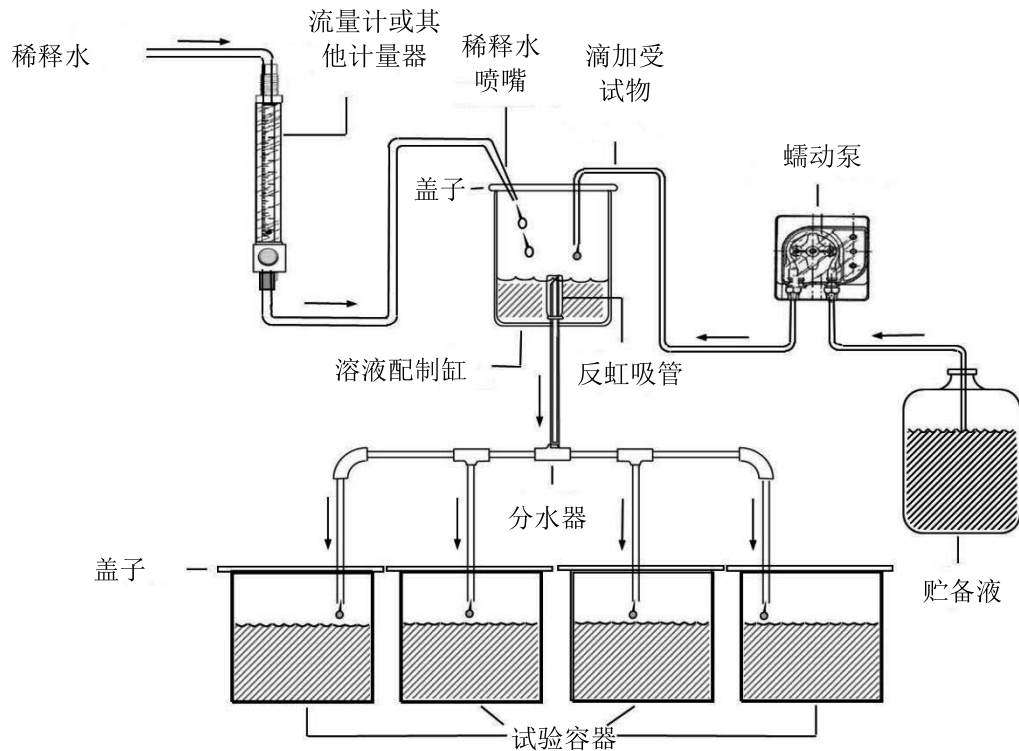


图 B.1 流水式暴露系统示意图

B. 2. 2 流水式暴露系统通常以试验介质或助溶剂配制高浓度的贮备液，通过逐级稀释配制不同浓度的受试溶液。

B. 2. 3 溶液更新频率是流水式暴露系统的重要参数，通常以 24 h 内全部溶液更新次数表示（如 2 次/24 h）。应选择可维持水质和稳定暴露浓度的最低溶液更新频率。对于溞类和幼鱼等易受到频繁换水胁迫的受试生物，不宜采用 >6 次/24 h 的溶液更新频率。

B. 2. 4 暴露浓度分析过程的注意事项

a) 若实测浓度能保持在配制浓度的 80 %~120 %之内，应至少在试验开始、中间和结束时采样分析最高、最低和接近预期试验终点（如 NOEC、EC_x）的浓度。试验持续时间超过 7 d 时，应每周测量一次。若实测浓度下降超过 20 %，应分析所有试验浓度，并增加采样分析频率，各试验平行应分别测定。

b) 若贮备液进行了更新，应在更新周期开始和结束时分别测定贮备液浓度。若受试物在贮备液中可维持稳定暴露浓度，至少每周在更新周期开始时测定一次最低、中间以及最高浓度组的浓度。

c) 当同一处理组不同平行的受试溶液由同一个分水器提供时，只需对每个处理组的一个平行样品进行分析。宜采集并储存所有平行的样品，以在出现异常结果时补充分析，查明异常数据出现的原因。

附录 C

(资料性附录)

时间加权平均浓度的计算方法

C.1 流水式暴露系统

对于流水式暴露系统，时间加权平均浓度可按公式 (C.1) 计算：

$$C_w = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(c_{start,i} + c_{end,i})}{2} w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (C.1)$$

式中：

C_w ——时间加权平均浓度，mg/L；

n ——采样次数，次；

$C_{start,i}$ ——周期 i 新受试溶液的实测浓度，mg/L；

$C_{end,i}$ ——周期 i 旧受试溶液的实测浓度，mg/L；

w_i ——周期 i 浓度测量间隔的小时数或天数，h 或 d。

C.2 半静态暴露系统

对于半静态暴露系统，时间加权平均浓度可按公式 (C.2) 计算：

$$C_w = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(c_{old,i} - c_{new,i})}{\ln c_{old,i} - \ln c_{new,i}} w_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (C.2)$$

式中：

C_w ——时间加权平均浓度，mg/L；

n ——采样次数，次；

$C_{new,i}$ ——周期 i 新受试溶液的实测浓度，mg/L；

$C_{old,i}$ ——周期 i 旧受试溶液的实测浓度，mg/L；

w_i ——周期 i 浓度测量间隔的小时数或天数，h 或 d。