

附件 3

《难测试化学物质水生毒性测试技术指南
(征求意见稿)》
编制说明

《难测试化学物质水生毒性测试技术指南》编制组

2024 年 12 月

目 录

1	项目背景	2
1.1	任务来源	2
1.2	工作过程	2
2	标准制订的依据及必要性分析	3
2.1	制订本标准的法规依据	3
2.2	保证新化学物质环境管理登记数据质量的迫切需求	3
2.3	完善化学物质环境风险评估与管控技术标准体系的要求	3
3	国内外相关标准情况	3
3.1	主要国家、地区及国际组织相关测试方法研究	3
3.2	国内相关标准情况	5
3.3	国内外相关标准对比分析	5
3.4	国内化学物质测试机构现有处理方法及存在问题	6
4	标准制订的基本原则和技术路线	10
4.1	标准制订的基本原则	10
4.2	标准制订的技术路线	10
5	标准主要技术内容	11
5.1	标准结构框架	11
5.2	标准主要技术内容确定的依据	11
6	与国内外同类标准或技术法规的水平对比分析	16
7	标准实施建议	17
8	参考文献	17

1 项目背景

1.1 任务来源

依据《关于开展 2021 年度国家环境保护标准项目实施工作的通知》（环办科技函〔2021〕312 号）和《国家环境保护标准制修订工作管理办法》（国环规科技〔2020〕4 号）的有关规定，生态环境部固体废物与化学品司正式下达“特殊属性化学物质水生态危害测试指南”的国家环境保护标准项目任务书，项目编号 2021-86 号。任务承担单位为生态环境部南京环境科学研究所和生态环境部固体废物与化学品管理技术中心。

1.2 工作过程

1.2.1 成立标准编制小组

2021 年 1 月，承担单位接到标准编制任务后，生态环境部南京环境科学研究所立即进行项目启动研讨会，成立标准方法编制组，确定任务分工，安排实施进度。

1.2.2 文献调研

2021 年 1-6 月，标准编制组开展了国内外难测试化学物质相关试验方法的研究进展调研，系统查阅了国内外有关标准和文献资料，分析了国内测试机构目前的做法及存在问题，编制《特殊属性化学物质水生态危害测试指南》（初稿）。

2021 年 7 月，征求有关专家建议，经编制组多次反复研讨和修改完善，编制完成了《特殊属性化学物质水生态危害测试指南》开题报告和标准草案。

1.2.3 标准开题论证

2021 年 9 月 27 日，线上召开“特殊属性化学物质水生态危害测试指南”开题论证会，通过专家对标准初稿的技术审查，会议建议按照《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565—2010）进一步修改文字表述和格式。

1.2.4 标准征求意见稿编制

按照《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565—2010），参照编辑性修改原则，并结合测试实验室的测试经验，对标准草案格式及文本内容进行了重新编辑，并编写了编制说明。

1.2.5 标准征求意见稿专家审查会

2023 年 1 月 13 日，线上召开“特殊属性化学物质水生态危害测试指南”征求意见稿专家审查会，会议建议将标准名称修改为“难测试化学物质水生毒性测试技术指南”，并进一步修改完善标准文本。因此，编制组根据专家意见，将标准名称修改为《难测试化学物质水生毒性测试技术指南》。此后，又根据化学品处意见，对标准征求意见稿格式及文本内容进行了重新编辑，并修改了编制说明。

2024 年 9 月 27 日，线上召开《难测试化学物质水生毒性测试技术指南》标准征求意见稿专家审查会，会议建议：完善标准的适用范围表述；完善难测试化学物质的定义；按照

HJ 565 进一步修改完善标准文本。因此，再次根据本次的专家意见，对标准征求意见稿以及编制说明进行了修改。

2 标准制订的依据及必要性分析

2.1 制订本标准的法规依据

为贯彻《中华人民共和国环境保护法》《中华人民共和国水污染防治法》等法律法规，落实《新污染物治理行动方案》（国办发〔2022〕15号），促进化学物质生态毒性测试技术的进步，保护生态环境，制订本标准。

2.2 保证新化学物质环境管理登记数据质量的迫切需求

根据《新化学物质环境管理登记办法》（生态环境部令第12号），新化学物质生产者或进口者，应当在生产前或进口前进行申报，申报前需要开展新化学物质物理化学性质、健康毒理学和生态毒理学特性测试，提交相关测试报告。

为了指导化学物质生态危害测试，我国已制定了藻、溞、鱼等不同营养级水生生物毒性测试的国家标准（GB/T 21805—2008、GB/T 21830—2008、GB/T 21796—2008等）、化学品测试导则（HJ/T 153—2004）等方法。这些标准、导则对于指导常规化学物质的水生生态毒理学测试发挥了重要作用，但对于难溶、易挥发、易光解/水解/氧化、多成分等难测试化学物质的水生毒性测试并未给出细化的处理方法。而实际操作中，这些难测试属性可能导致现有测试方法中的受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存、暴露浓度分析、毒性结果表征等过程难以操作，给测试人员带来技术困扰。为了确保新化学物质环境管理登记数据的可靠性，弥补现有化学物质测试方法的不足，有必要在现有化学物质测试方法的基础上，制订针对难测试化学物质的水生毒性测试技术指南。

2.3 完善化学物质环境风险评估与管控技术标准体系的要求

《新污染物治理行动方案》明确提出“建立化学物质环境风险评估与管控技术标准体系，制定修订化学物质环境风险评估、经济社会影响分析、危害特性测试方法等标准”。为落实这一要求，生态环境部印发《化学物质环境风险评估与管控技术标准体系框架（2024年版）》（环办固体函〔2024〕351号），其中明确提出“以新化学物质环境管理登记的最低数据要求和优先评估化学物质环境与健康风险筛选技术要求为核心，在现行国家标准和行业标准的基础上，优先补齐短板，制订难测试化学物质水生毒性测试技术指南……”。

3 国内外相关标准情况

3.1 主要国家、地区及国际组织相关测试方法研究

3.1.1 欧盟

欧洲生态毒理学和化学品毒理学中心(ECETOC)1996年发布了26号专题报告《Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances》（以下简称 ECETOC

Monograph No. 26), 为具有低溶解性、强吸附、易挥发、不稳定性、光衰减(颜色)和多成分等属性的物质的水生态毒性试验提供了试验解决方案、测试策略以及结果解释的指导。2003年,该中心发布了《Environmental Risk assessment of difficult substances》(ECETOC 88号技术文件),用以解决难测试物质的测试难题。

3.1.2 美国环保署(EPA)

EPA 目前没有发布专门的难测试化学物质水生毒性测试指南标准。但其在1996年发布的《Ecological Effects Test Guidelines – Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies》(OPPTS 850.1000) 导则中,针对难溶物质,提出了替代测试方法,包括提高稀释水中受试物的溶解度、乳化剂和剂型试验、测试前分离可溶部分等。

3.1.3 英国环境部(DoE)

DoE 在1996年发布了《Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances》,对多种难测试物质提出了改良的水生毒性测试方法。

3.1.4 联合国(UN)

联合国目前没有发布专门的难测试化学物质水生毒性测试指南标准,但在其发布的《全球化学品统一分类和标签制度(全球统一制度)》(简称GHS)附件中对水生毒性测试进行了介绍。以第7修订版(英文版)为例,附件A9.3.5部分包含难测试物质的水生毒性测试内容,提出了易降解、难溶、多成分等难测试物质水生毒性测试的改进方法。

3.1.5 经济合作与发展组织(OECD)

1998年,OECD专家组在法国巴黎小组会议上提出了关于难测定物质和混合物的水生生物毒性测试导则文件第一版草案。该草案考虑了英国、美国、欧盟、丹麦以及欧洲石油公司环境、健康与安全组织的相关文件。经专家组讨论,在英国《Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances》及ECETOC Monograph No. 26的基础上,综合专家组以及国际评审专家的意见,形成2000年发布的OECD测试与评估第23号指南。2019年2月,根据最新的测试问题与方法,OECD发布了该文件的第二版(《Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals》,以下简称OECD GD 23)。

3.1.6 美国材料与试验协会(ASTM)

2004年,ASTM针对润滑油制订了水生毒性测试的样品制备和结果解释标准《Standard Practice for Aquatic Toxicity Testing of Lubricants: Sample Preparation and Results Interpretation》(ASTM D6081)。该标准2009年、2014年、2019年、2020年先后进行了4次修订。该标准中提出的水载荷组分(WAFs)、水溶性组分(WFs)等溶液配制方法适用于鱼类、大型无脊椎动物以及藻类的急慢性水生毒性测试。

3.1.7 国际标准组织(ISO)

ISO 目前没有发布专门的难测试化学物质测试指南,但有3个标准与水生毒性测试相关。1997年发布的《ISO 5667—16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples》包含了水溶性极差或超出水溶性限值的测试溶液制备方法。2006年发布了针对难溶物质、易挥发物质、金属以及污水的藻类生长抑制试验指南《ISO 14442 Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water》。2018年发布了针对难溶有机物生物降解性测试溶液制备的《ISO

10634 Water quality — Preparation and treatment of poorly water—soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium》。

3.2 国内相关标准情况

2018年，农业农村部发布了《难处理农药水生生物毒性试验指南》(NY/T 3273—2018)，该标准针对农药，适用于难溶（或略溶）于水、低浓度时表现毒性、易挥发、易降解、易被吸附、有颜色、疏水性、离子型和多成分等供试物及农药制剂的水生生物毒性试验，对供试物稳定性的初步评估、试验溶液制备和暴露体系选择、样品采集及试验结果的计算与表达等进行了规定，适用于化学农药的水生生物毒性试验。该标准主要参考了2000年发布的OECD GD 23，尚未根据2019年第二版内容更新。该标准引用的测试标准主要为农业行业标准，难以满足化学物质水生毒性测试的需求。

除NY/T 3273外，目前我国尚未发布其他相关的标准。

3.3 国内外相关标准对比分析

国内外相关标准的对比分析结果见表1。综合分析结果，本标准选择OECD GD 23作为主要参考文件进行编制，主要原因包括：

(1) OECD GD 23 涵盖的难测试属性最全面。

英国和ECETOC在国际上最早发布难测试物质水生毒性测试相关技术导则，OECD GD 23整合了英国和ECETOC相关导则并保持更新。就技术内容而言，OECD GD 23涵盖的难测试属性最全，其他国外导则只涉及其中一种或有限几种难测试属性。

(2) OECD GD 23 与我国化学物质生态毒理测试技术标准（导则）相关测试过程、结果和术语的描述相对一致，衔接更顺畅。

我国化学物质生态毒理测试主要参考化学品测试导则（HJ/T 153—2004）以及化学品测试系列国家标准（GB/T 21805—2008、GB/T 21830—2008、GB/T 21796—2008等），这些方法等同采用OECD相关测试导则。而OECD GD 23与OECD相关测试导则一脉相承，对相关测试过程、结果和术语的描述相对一致，因此与我国化学物质生态毒理测试技术标准（导则）的衔接更顺畅。

(3) OECD GD 23 是多个国际相关化学物质测试管理文件的技术依据，是目前国内外化学物质测试机构主要参考的准则。

目前国际上与难测试物质水生毒性测试相关的管理文件主要参考OECD GD 23制定，包括：《Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals(GHS)》Annex 9 guidance on hazards to the aquatic environment；《ISO 5667—16 Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples》《ISO 14442 Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water》等ISO水生生态毒理测试方法；《Environmental Risk assessment of difficult substances》(ECETOC Technical Report 88)；《Background and Special Considerations-Tests with Aquatic and Sediment-Dwelling Fauna and Aquatic Microcosms》(美国化学物质生态效应测试导则OCSPP 850.1000)。

3.4 国内化学物质测试机构现有处理方法及存在问题

3.4.1 国内化学物质测试机构现有处理方法

目前国内化学物质生态毒理学测试机构（以下简称“国内测试机构”）针对难测试化学物质的处理，主要参考 OECD GD 23，主要做法总结如下：

对于难溶受试物，国内测试机构主要是针对不同情形采用不同的溶液配制方法，其中最常用的是直接添加法（包括进一步过滤或离心后形成饱和溶液的方法）、助溶剂法、WAFs/WSFs（针对多成分物质及不明复杂物质），以及发生器法中的固液饱和法。样品采集时，为了避免采样不均匀，测试机构一般采集试验容器中的全部样品或从不同位置取样后混样。

对于易挥发受试物，国内测试机构主要根据挥发性强弱采用不同溶液更新频率的暴露系统。同时在整个测试过程中采用减少容器液面顶部空间或保持溶液充满容器（零顶空）等方式尽可能减少挥发损失。对于无法使用半静态暴露系统的藻类毒性试验，一般使用密闭容器开展试验，同时根据需要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。

对于易降解受试物，国内测试机构主要参考 OECD GD 23 选择测试对象。对于需要开展降解产物测试的，测试机构优先协商委托方提供降解产物纯品，无法获取时，采用延长母体受试溶液放置时间的方式获取降解产物的受试溶液，具体放置时间通过预研究确定，以尽可能提高受试溶液中降解产物含量为准。对于需要开展母体受试物测试的，测试机构考虑其水解、光解、生物降解特性采用增加溶液更新频率、避光等方法尽可能减少母体损失。

对于强吸附受试物，国内测试机构主要通过使用试验容器预饱和和处理、避免膜过滤操作等方式减少受试物的吸附损失。对于上述操作仍难以维持稳定暴露浓度的，采用使用半静态或流水式暴露系统来代替静态暴露系统，提高受试溶液的更新速率或频率。

对于络合性受试物，国内测试机构主要通过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浓度的方式，减少络合作用造成受试物生物有效性的损失。

对于有色受试物，国内测试机构主要通过减少受试溶液体积、提高振摇速度的方式减少高浓度有色受试溶液对藻类光合作用的遮蔽效应。

对于疏水性受试物，国内测试机构在受试溶液配制方面采用与难溶受试物类似的方法处理。此外，对于出现局部受试物聚集现象或形成油膜的情况，重点关注出现抑制或死亡的受试生物体表是否有受试物附着。若出现体表附着的情况，则采用过滤或离心去除不溶物，或者去除受试物膜后重新开展测试。

对于离子化受试物，国内测试机构主要在相关测试导则允许的 pH 值范围内开展试验。

对于多成分物质及不明复杂物质，国内测试机构主要通过 WAF/WSFs 法配制受试溶液。

此外，暴露浓度分析和毒性结果表征是各类难测试化学物质均可能涉及的技术难题，但 OECD GD23 在这方面缺少细节规定。在暴露浓度分析方面，国内测试机构一般会采用机构已有的色谱、光谱、色谱-质谱联用以及电感耦合等离子体质谱等特定化学分析仪器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，一般采用总有机碳（TOC）分析仪进行 TOC 检测。在实测浓度表征方面，对测试方法进行改进后仍不能维持稳定暴露浓度时，暴露浓度以实测浓度的几何平均值或算数平均值、时间加权平均浓度表示。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低于定量限或检出限，一般以“低于定量限或检出限”表示并给出相应的定量限或检出限结果。采用 TOC 等综合性指标方法表征暴露浓度时，部分测试机构采用配制浓度或者承载率来表征暴露浓度，部分测试机构用综合性指标折算受试物浓度。在毒性结果表征方面，国内测试机构主要以溶解态受试物浓度表征，必要时同时给出全部受试物浓度。多成分物质及不明复杂物质的毒性结果一般以一种或几种可识别组分浓度表征，同时给出配制浓度。

3.4.2 存在问题

目前国内化学物质生态毒理学测试机构参考 OECD GD 23 实际处理难测试化学物质过程中仍存在以下问题：

一是国外测试导则未提及但实际检测中遇到的问题，主要包括：低于定量限或检出限的实测浓度表征方法、UVCBs 物质测试结果表征方法、TOC 等综合性指标的选择和结果表征问题。

二是国外测试导则对某些处理方法缺乏细节描述、实际操作困难的问题。主要包括：针对多成分物质及不明复杂物质的 WSFs 的配制方法、不能维持稳定暴露浓度状态下的实测浓度表示方法、易降解受试物测试对象的选择方法；离子化受试物测试 pH 值条件的确定方法。

三是由于国内外法规、标准或术语的差异而引起的衔接、解读困难等细节问题，如 OECD GD 23 引用了欧盟化学物质环境管理政策、国外其他相关测试方法等其他文件要求，无法与国内相关要求衔接；难测试属性识别方法不具体；每一种难测试化学物质的处理方法未按照测试过程描述，且行文冗长，要点不清晰。

表 1 国内外相关标准的对比分析结果

技术导则	适用范围	难测试属性识别	暴露系统选择与维护	试验溶液制备	暴露浓度分析	毒性结果的计算和表述
OECD GD 23	(1) 适用于难测试化学物质的水生毒性测试。 (2) 适用于受试物溶解部分的水生毒性测试。除稳定分散体外。 (3) 不适用于含不溶相的受试物，不适用于纳米材料。	(1) 当测试过程中受试物的暴露浓度显著下降时，应改进受试溶液的制备方法以及暴露系统，以保证浓度下降低于 20%。 (2) 试验开始前，应能够获得证明受试物在测试条件下稳定性的数据，包括理化性质、测试条件下受试物稳定性的初步研究结果。	(1) 当测试周期内受试物稳定，即不更新试验溶液，暴露浓度可以维持在配制浓度的 80~120% 时，宜选择静态法。 (2) 当受试物稳定时间 ≥ 12 h，但小于测试周期时，宜选择半静态或间歇流水式暴露系统。 (3) 当受试物稳定时间 < 12 h 时，宜使用连续流水式的暴露系统。	根据物质的难测试属性，分别介绍。	包括 3 种暴露系统的采样时间要求、样品采集及分析方法考虑要素。	(1) 实测浓度在配制浓度的 80%~120% 以内；实测浓度或者配制浓度表示。 (2) 实测浓度在配制浓度的 80%~120% 范围以外；实测浓度表示。 (3) 无法定量分析：采用配制浓度或者承载率来表示。
ECETOC Monograph No. 26	适用于难溶、易挥发以及不稳定物质。	与 OECD GD23 类似。	(1) 包括静态、半静态和流水式。 (2) 如果使用静态系统不能使实测浓度维持在适当的限度内，应采用半静态或流水式。	介绍了助溶剂法、分散剂法、WAF。	包括 3 种暴露系统的采用时间表和样品采集。	(1) 对于静态和半静态试验，结果应表示为实测浓度的几何平均值。 (2) 在流水式测试中，使用算术均值。
OPPTS 850.1000	主要针对难溶物质。	不涉及	(1) 包括静态、半静态和流水式。 (2) 预期在试验期间浓度会下降到初始实测浓度的 70%，应采用半静态或流水式系统。	未详细介绍试验溶液制备。	试验开始和结束时分析暴露浓度，以暴露浓度维持在配制浓度的 70% 作为稳定性标准。	不涉及
ASTM D6081	润滑油水生毒性测试的样品制备。	以不同的搅拌时间间隔 (3h、6h、12h、24h、36h) 取样分析，评估稳定性。	不涉及	包括 WAF、WSF、机械悬浊液三种配制方法。	包含样品采集的相关内容。	不涉及

技术导则	适用范围	难测试属性识别	暴露系统选择与维护	试验溶液制备	暴露浓度分析	毒性结果的计算和表述
GHS 7	适用于易降解物质、难溶物质、造成浓度降低的其他因素、试验介质的扰动、络合物等。	不涉及	不涉及	部分难测试属性简单提及溶液配制。	不涉及	不涉及
ISO 5667—16	难溶或配制浓度超出水溶性限值的物质。	不涉及	不涉及	只针对2种难测试属性，介绍了WAFs、WSF溶液的配制方法。	不涉及	不涉及
ISO 14442	水溶性差、易挥发物质、金属类物质，仅针对藻类生长抑制试验。	不涉及	不涉及	只针对3种难测试属性，介绍了饱和溶液和过饱和溶液、助溶剂、乳浊液、WAFs、WSF溶液。	仅说明浓度分析的必要性。	参考ISO 8692、ISO 10253、ISO 5667。
ISO 10634	只针对难溶物质生物降解试验的溶液制备。	不涉及	不涉及	只针对难溶物质，介绍了直接加入法、超声法、载体法、助溶法等。	不涉及	不涉及
NY/T 3273	针对农药，适用于难溶（或略溶）于水、低浓度时表现毒性、易挥发、易降解、易被吸附、有颜色、疏水性、离子型和多成分等供试物及农药制剂。	附录中包括查阅相关数据进行初步评估和稳定性试验两种方式。	根据受试物的特性（难溶、低浓度有毒、易挥发、易降解、易被吸附、有色、疏水、离子型以及多成分），与溶液配制合并描述。	根据受试物特性（难溶、低浓度有毒、易挥发、易降解、易被吸附、有色、疏水、离子型以及多成分），与暴露体系的选择合并描述。	样品采集根据试验类别（藻类、浮萍、溘类急性、溘类繁殖、鱼类急性以及鱼类慢性毒性）分别描述。	根据暴露浓度的稳定性，可用配制浓度、实测浓度或实测浓度几何平均值计算。

4 标准制订的基本原则和技术路线

4.1 标准制订的基本原则

(1) 针对性原则

本标准针对我国化学物质水生毒性测试的技术现状和存在问题，梳理产生测试难题的主要难测试属性，综合国际已有技术导则和我国化学物质生态毒理测试机构的实际经验，提出具体的应对措施，着力提升难测试化学物质测试方法的科学性、规范性。

(2) 本土化修改原则

本标准在与 OECD GD 23 主要技术原则保持一致的基础上，根据我国化学物质水生毒性测试的实际情况和环境保护标准编制的内容与格式要求进行本土化修改，主要体现在三个方面：

一是技术内容方面根据我国化学物质水生毒性测试实际情况进行完善。包括：难测试属性判定标准与我国相关标准或技术导则相衔接，如：易光解、易水解以及强吸附属性识别的评估指标参考了《新化学物质环境管理登记指南》（生态环境部公告 2020 年第 51 号）中遇水/光分解的定义以及强吸附性的判断标准；多成分以及成分不明复杂主要参考了 HJ 1357；针对我国新化学物质水生毒性测试中难测试化学物质实测浓度和毒性测试结果缺少规范统一的表征方法问题，根据相关测试基本原理和测试机构经验，在“暴露浓度分析”和“毒性结果的计算和表述”部分提出了统一的表征方法；同时，结合近年来检测分析仪器设备更新应用情况，更新了常用的暴露实测手段。

二是基本架构方面根据我国的《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1）以及《环境保护标准编制出版技术指南》（HJ 565—2010）进行调整。调整原则包括：①保持语言精炼，删除解释性的描述；②引用的国外标准名称替换为国内对应标准；③保持正文中各难测试属性对应的技术内容篇幅大致相当，多处引用的内容或涉及技术细节较多的内容调至附录。

三是行文按照中文习惯进行梳理、归纳。针对每一类难测试属性，首先描述难测试属性所导致的测试难题，接着给出针对这种测试难题的测试方法改进策略，行文更符合中文习惯，增强可读性。

4.2 标准制订的技术路线

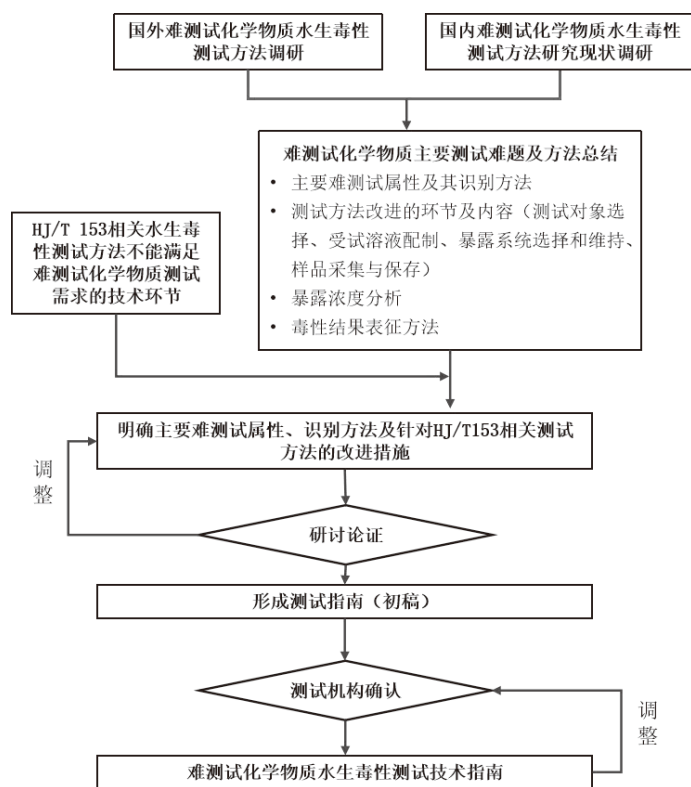


图 1 技术路线

5 标准主要技术内容

5.1 标准结构框架

结构框架包括：

- 1) 适用范围
- 2) 规范性引用文件
- 3) 术语和定义
- 4) 总体测试程序
- 5) 难测试属性识别
- 6) 测试方法改进
- 7) 暴露浓度分析和毒性结果表征

附录 A 难溶受试物受试溶液配制方法

附录 B 暴露系统的选择与流水式暴露系统

附录 C 时间加权平均浓度的计算方法

5.2 标准主要技术内容确定的依据

5.2.1 标准适用范围

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。

5.2.2 规范性引用文件

《化学物质环境管理 化学物质测试术语》(HJ 1257)、《化学物质环境管理命名规范》(HJ 1357) 涵盖本标准部分术语，因此将其作为规范性引用文件。

本标准是化学品测试导则 (HJ/T 153) 的补充，涉及的技术细节是 HJ/T 153 中相关测试技术导则的补充。因此，化学品测试导则 (HJ/T 153) 也作为规范性引用文件。

5.2.3 术语和定义

本标准所用的术语，包括承载率、难溶物质、受试物、受试溶液、不明复杂物质、水载荷组分、水溶性组分、多成分物质可参考 HJ 1257 以及 HJ 1357，本标准未重复定义。

水溶解度、混合/配制、杂质、乳浊液、悬浊液、表面活性剂、化学分散剂/乳化剂、水溶性溶剂 8 个术语为通用常见的术语，本标准未作特殊规定。

难测试化学物质的定义与 HJ 1257 保持一致。但为了衔接正文描述的难测试属性，参照 OECD GD 23，在定义后增加了难测试属性的界定，即：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。

稳定暴露浓度、试验介质、临界胶束浓度参照 OECD GD 23 第一节进行了定义。溶解态浓度的定义参考 HJ 1257 中溶解性有机碳的定义。

5.2.4 总体测试程序

规定了难测试化学物质水生毒性测试的程序，包括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。该部分的描述与图 1 以及第 5~第 7 部分的结构保持一致。

5.2.5 难测试属性识别

本部分给出后文重点讨论的难溶、易挥发、易降解、强吸附、络合性、有色、疏水性、离子化、多成分/成分不明复杂等难测试属性的识别方法。其中，“基于现有数据的难测试属性识别”中的难溶、易挥发、离子化、疏水性、易生物降解的评估指标与 OECD GD 23 第 5.1 节一致；易光解、易水解以及强吸附属性识别的评估指标参考了《新化学物质环境管理登记指南》（生态环境部公告 2020 年第 51 号）中遇水/光分解的定义以及强吸附性的判断标准；多成分以及成分不明复杂主要参考了 HJ 1357；易氧化、络合性以及有色属性识别的评估指标根据参考文献^{[11]-[13]}制订。“基于预研究的难测试属性识别”参考 OECD GD 23 第 5.2 节部分的内容。

5.2.6 测试方法改进

本部分提出了具有难溶、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 9 种难测试属性的化学物质开展水生毒性测试时可以采用的改进措施。为了提升内容的系统性、增强可读性，各小节均首先在“一般要求”中提出相关难测试属性可能造成的测试难题，然后针对测试难题选择性地从测试对象选择、受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存以及特定测试项目注意事项等方面分别给出改进措施建议，便于操作人员理解和掌握。

5.2.6.1 难溶受试物

对于难溶受试物，水生毒性测试的难点在于因受试物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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存 3 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.2 易挥发受试物

对于易挥发受试物，水生毒性测试的难点在于受试溶液配制、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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存以及特定测试项目注意事项 4 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.3 易降解受试物

对于易降解受试物，水生毒性测试的难点在于受试物母体与其降解产物的毒性可能存在显著差异，因此，需选择测试对象。此外，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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从测试对象选择、受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存以及特定测试项目注意事项 5 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.4 强吸附受试物

对于强吸附受试物，水生毒性测试的难点在于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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、暴露系统选择和维持、样品采集与保存以及特定测试项目注意事项 4 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.5 络合性受试物

对于络合性受试物，水生毒性测试的难点在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。另外，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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、暴露系统选择和维持 2 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.6 有色受试物

对于有色受试物，水生毒性测试的难点在于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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后主要对受此影响的藻类、溞类以及鱼类毒性试验等特定测试项目给出了相应的改进措施。

5.2.6.7 疏水性受试物

对于疏水性受试物，水生毒性测试的难点在于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。此外，这类物质的 K_{ow} 一般较大，因此还兼具难溶、强吸附的难测试属性，需同时考虑。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、暴露系统选择和维持 2 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.8 离子化受试物

对于离子化受试物，水生毒性测试的难点在于这类物质的测试中，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。因此，需确定合适的测试 pH 值条件，确保测试结果能反映受试物毒性的最大值。此外，在藻类毒性试验中，由于藻类的生理活动导致 pH 值变化明显，需额外注意减少 pH 值偏移。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、特定测试项目注意事项 2 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.9 多成分物质及不明复杂物质

对于多成分物质及不明复杂物质，水生毒性测试的难点在于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。因此，首先在“一般要求”中提出该测试难题，然后从受试溶液配制、样品采集与保存 2 个方面分别给出了相应的改进措施。

5.2.6.10 其他说明

OECD GD 23 中所涉合金类受试物、饱和浓度或低浓度下的测试的情形未在本标准中专门说明，原因如下：

(1) OECD GD 23 第 7.10 节关于合金类受试物的描述，仅介绍了此类物质可参考相关文件考虑其在水介质中的转化\溶解，未规定改进水生毒性测试方法的实质性内容。因此，本标准未采纳相关内容。

(2) OECD GD 23 第 7.12 节关于饱和浓度或低浓度下的测试的描述, 主要包括证明已达到饱和浓度的证据以及低浓度下如何配制试验溶液或者缺乏合适分析方法的解决方案。考虑这类物质主要是暴露浓度分析方面存在困难, 该测试难题可通过本标准“暴露浓度分析和毒性结果表征”中相关方法加以解决, 因而不再另行说明。

5.2.7 暴露浓度分析和毒性结果表征

“暴露浓度分析和毒性结果表征”是化学物质水生毒性测试的重要内容, 与测试结果的准确性直接相关, 但在 HJ/T 153 中缺少技术细节的规定, 且 OECD GD23 缺乏细节描述, 故而设置本节内容。此外, 因本标准所涉及的 9 种难测试属性均可能遇到“暴露浓度分析和毒性结果表征”方面的测试难题, 因此这部分内容单独成节, 置于 9 种难测试属性“测试方法改进”之后。

5.2.7.1 暴露浓度分析

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; 或者获得检测结果之后不能规范、准确表征暴露浓度。因此本小节从分析方法选择、实测浓度表征两个方面进行说明。

5.2.7.2 毒性结果表征

主要针对单成分物质和多成分物质毒性结果的表征主体进行说明, 如溶解态或全部受试物的浓度、其中一种组分浓度或全部组分总浓度。

5.2.8 附录

5.2.8.1 附录 A 难溶受试物受试溶液配制方法

难溶是最普遍的难测试属性, 其涉及的受试溶液配制方法改进策略较多, 为了保持正文的简明性, 维持各难测试属性测试方法改进策略行文篇幅相当, 本标准将难溶受试物受试溶液配制方法列为附录 A。

5.2.8.2 附录 B 暴露系统的选择与流水式暴露系统

易挥发、易降解、强吸附等多个难测试属性均需从暴露系统选择方面进行方法改进, 为了避免语句重复, 本标准将暴露系统的选择置于附录 B, 以便多处引用。此外, 重点介绍了 HJ/T 153 所缺少的流水式暴露系统中溶液更新频率、暴露浓度分析过程等相关要求。

5.2.8.3 附录 C 时间加权平均浓度的计算方法

时间加权平均浓度为本标准“7.1.2 实测浓度表征”部分提出的表征方法之一, 计算方法相对比较复杂, 为了计算的准确性和可比性, 本标准明确了流水式以及半静态暴露系统的时间加权平均浓度的计算方法。

6 与国内外同类标准或技术法规的水平对比分析

本标准在与国际权威的 OECD GD 23 主要技术原则保持一致的基础上，同时吸收其他国内外同类标准在某些技术细节方面的有益做法，在保证科学性的同时，覆盖的难测试属性更全面，测试策略的可操作性更强。以下从适用范围、难测试属性识别、受试溶液配制、暴露系统选择和维持方法、暴露浓度分析以及毒性结果的计算和表述 6 个方面进行对比分析：

从适用范围来看，本标准适用范围全面囊括难溶、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 9 类难测试属性，覆盖化学物质水生毒性测试中存在技术难题的主要难测试属性，与 OECD GD 23 及 NY/T 3273 相似。而除了 OECD GD 23 及 NY/T 3273（依据 OECD GD 23 编制）之外的其他同类标准只涉及一个或少数几个难测试属性（ECETOC Monograph No. 26、OPPTS 850.1000、GHS 7、ISO 5667—16），或者只适用于某一类物质（ASTM D6081）或者某一类测试（ISO 14442、ISO 10634）。

从难测试属性识别方法来看，本标准相关识别方法与 OECD GD 23、ECETOC Monograph No. 26 及 NY/T 3273 内容一致，但本标准识别方法更具体，考虑了我国相关化学物质环境管理技术文件要求，提高了难测试属性判定的可操作性和规范性。而 ASTM D6081 未全面给出所有难测试属性识别方法，其他同类标准则未涉及难测试属性识别方法。

从受试溶液配制来看，本标准相关做法与 OECD GD 23 及 NY/T 3273 基本一致，但在行文逻辑性和结构系统性上进一步提高。比其他同类标准给出的难测试物质溶液配制方法更全面。

从暴露系统选择和维持方法来看，本标准相关做法与 OECD GD 23、ECETOC Monograph No. 26、OPPTS 850.1000 及 NY/T 3273 基本一致，但本标准按照中文的行文习惯进行梳理、归纳，行文逻辑性和语言精炼性进一步提升。其他同类标准未涉及暴露系统选择。

从暴露浓度分析来看，本标准相关做法与 OECD GD 23、ECETOC Monograph No. 26 以及 NY/T 3273 基本一致，同时结合近年来检测分析仪器设备更新应用情况，梳理、归纳了常用的暴露实测手段，同时针对“改进后可达到稳定暴露浓度”“改进后仍不能达到稳定暴露浓度”分别给出了实测浓度表征方法。最后结合新化学物质水生毒性测试中经常遇到的问题，针对采用特定化学分析方法和 TOC 等综合性指标表征暴露浓度的方法分别进行了说明。比 ASTM D6081、ISO 14442 等其他标准相关内容更加全面、具体。

从毒性结果的计算和表述来看，本标准相关做法与 OECD GD 23、ECETOC Monograph No. 26 以及 NY/T 3273 基本一致，但本标准按照单成分、多成分物质分门别类地明确了毒性结果表征方法，增强了可读性。相关内容比 ISO 14442 等其他同类标准更全面、具体。

综上，本标准一方面与 OECD GD 23 等权威测试指南技术原则保持一致，保证了适用的难测试属性的全面性以及测试方法改进策略的科学有效性，另一方面根据我国化学物质水生毒性测试的实际需求，明确了采用特定化学分析方法和 TOC 等综合性指标表征暴露浓度的方法，根据最新检测技术应用情况更新了暴露实测方法指导，增强了标准的实用性。此外，本标准还根据国家生态环境保护标准格式及行文要求，对参考的 OECD 导则相关内容进行了梳理、整合，首先描述难测试属性所导致的测试难题，接着给出针对这种测试难题的测试方法改进策略，增强了行文的逻辑性和标准的可读性。

7 标准实施建议

本标准作为 HJ/T 153 相关水生毒性测试方法的补充，与 HJ/T 153 配套使用，可解决新化学物质和现有化学物质水生毒性测试过程中因受试物难溶、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所带来的测试难题，为新化学物质环境管理登记、优先评估化学物质的环境风险评估提供更加规范、准确的水生毒性测试数据，在此基础上进一步提升我国化学物质生态毒性测试技术能力和水平。

8 参考文献

- [1] OECD GD 23. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. 2000.
- [2] OECD GD 23. Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. 2019.
- [3] ECETOC Technical Report 88. Environmental Risk assessment of difficult substances. 2003.
- [4] ECETOC 1996. Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Brussels.
- [5] DoE 1996. Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances. United Kingdom Department of the Environment, London.
- [6] US EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines – OPPTS 850.1000. Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Public Draft, EPA 712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency.
- [7] ISO 14442:2006. Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waste water.
- [8] ISO 10634:2018. Water quality — Preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- [9] NY/T 3273—2018. 难处理农药水生生物毒性试验指南.
- [10] HJ 1257—2022. 化学物质环境管理 化学物质测试术语.
- [11] 董元彦, 左贤云, 邬荆平等. 无机及分析化学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Weber, B. (2023). Stability of Coordination Compounds. In Coordination Chemistry: Basics and Current Trends (pp. 13-34). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- [13] 张正行编著. 有机光谱分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.