

T/SHSOT^{2□}

团 体 标 准

T/SHSOTXXXX—XXXX

化学品 稀有鮡鲫胚胎急性毒性试验

Chemicals Rare minnow (*Gobiocypris rarus*) Embryo Acute Toxicity Test

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2021 年 9 月 30 日）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本标准和经济合作与发展组织（OECD）化学品测试导则 No. 236（2013）《化学品 鱼类胚胎急性毒性试验》（英文版）的技术内容相同。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由上海市毒理学会提出并归口。

本文件起草单位：上海市检测中心、XXXXXX。

本文件主要起草人：XXXXXXXXX。

本文件首批承诺执行单位：XXXXXXXXX。

稀有鮡鲫胚胎急性毒性试验

1 范围

本标准规定了化学品稀有鮡鲫胚胎急性毒性试验的术语和定义、受试物所需信息、原理、仪器设备、试验系统、试验程序、质量控制、数据与报告。

本标准适用于测试化学品对稀有鮡鲫胚胎的急性毒效应。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 21806-2008 化学品 鱼类幼体生长试验

GB/T 27861-2011 化学品 鱼类急性毒性试验

GB/T 29763-2013 化学品 稀有鮡鲫急性毒性试验

OECD Guidelines for the testing of chemicals. No. 236-2013 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

OECD Guidelines for the testing of chemicals. No. 215-2000 Fish, Juvenile Growth Test

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 静态试验 static test

以整个试验过程中试验介质不更换、不流动的方式进行的试验。

3.2 半静态试验 semi-static renewal test

以定期（如 24h）更换试验介质的方式进行的试验。

3.3 流水式 flow-through

以整个试验过程中试验介质自动、持续地被更换的方式进行的试验。

3.4 半数致死浓度 Median Lethal Concentration (LC₅₀)

对试验生物产生 50%致死效应的受试物估算浓度。

3.5 体节 Somite

脊椎动物在胚胎发育过程中沿身体前后轴形成的分布在神经管外侧的一定数目的、随着胚胎的继续发育分化成生骨节、生皮节和生肌节的中胚层团块。

3.6 板内质控 Internal Plate Control

24 孔板中用于验证试验过程中由制造商或研究者对 24 孔板造成的潜在的污染风险，包括任何可能影响试验结果的板效应（如，温度梯度）而加入试验用水的 4 个孔。

4 受试物所需信息

受试物所需信息包括：

- a) 水中溶解度；
- b) 蒸气压；
- c) 分子量；
- d) 结构式；
- e) CAS号；
- f) 纯度；
- g) 在水中和光照条件下的稳定性；
- h) pKa值；
- i) 水溶液中的定量分析方法；
- j) 正辛醇-水的分配系数（Pow）；
- k) 快速生物降解试验结果。

5 原理

浊度将新受精的鱼类胚胎暴露于不同浓度的受试物水溶液中 96 h。其后每 24 h，观察并记录以下 1～4 个死亡表征：（1）卵凝结；（2）体节缺失；（3）尾部未分离；（4）无心跳。当暴露结束时，根据上述 4 个表征确定急性毒性，并计算半数致死浓度（LC₅₀）。

6 设备与材料

6.1 仪器设备

仪器设备包括：

- a) 溶解氧测定仪（1%）；
- b) 水硬度计（1 mg/L）；
- c) pH计（0.1 pH）；
- d) 分析天平（0.0001 g）；
- e) 电导仪（1 μs/cm）；
- f) 至少可放大80倍的显微镜，用于观察的场所应维持在（26±1）℃之间，如无法保持，应使用温控横向运动载物台或其它手段维持温度；
- g) 培养箱或带有温控的房间；
- h) 适用于流水式的连续分配和稀释系统。

6.2 材料

- a) 化学惰性材料制成的鱼缸，其容积应适于推荐的承载量（见7.2.2）；
- b) 玻璃或聚苯乙烯材质的试验容器（如，深度约为20 mm的标准24孔板，每孔体积2.5 mL -5 mL）；
- c) 用于覆盖24孔板的盖子或膜；

d) 产卵网箱：包含产卵箱、网架（孔径大小为 $2\text{ mm}\pm 0.5\text{ mm}$ ，用于保护鱼卵产出后不被成鱼捕食）以及产卵基质（如，仿生植物），均由化学惰性材料制成；

e) 用于收集鱼卵的宽口吸液管。

7 试验系统

7.1 试验方式的选择

在试验之前，应根据受试物在水中的溶解度和化学稳定性确定合适的试验方式（静态试验系统、半静态试验系统或流水式试验系统），然后选定需用的容器和装置。半静态试验方式和流水式试验方式的选择见7.6.2和7.6.3。

7.2 稀有鮕鲫

7.2.1 亲鱼选择

挑选来源明确，有良好受精率记录的稀有鮕鲫用作产卵亲鱼。产卵前，亲鱼无肉眼可观察的感染或疾病，且2个月以上未经过任何（急性或预防性）药物处理。

7.2.2 亲鱼驯养条件

亲鱼推荐的驯养承载量为1尾/升水。亲鱼应在养鱼场和实验室条件（pH为6.5~8.5；温度为 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ；光照为每天12 h~16 h光照；溶解氧浓度不低于空气饱和值的80%）下驯化和饲养。

7.2.3 产卵

试验用鱼卵可通过分组产卵（单独产卵箱）或集中产卵（驯养鱼缸）获得。分组产卵时，可在试验前一天将数对亲鱼（雌雄数量比为1:2）放置于产卵箱中，为保证获得足够数量的鱼卵，建议平行准备至少3组。所有获得的鱼卵应混合后随机选取。此外，为防止亲鱼捕食鱼卵，应在产卵箱或驯养鱼缸中放入网架（孔径大小为 $2\text{ mm}\pm 0.5\text{ mm}$ ）。如必要，还可放置一些惰性材料制成的仿生植物刺激产卵。受精完成后，用试验用水润洗鱼卵，并收集。

7.2.4 鱼卵的分化与选择

在 26°C 时，受精卵在约45min后开始第一次分裂，并且连续分裂至4、8、16和32细胞期。采用至少可放大30倍的体视显微镜观察，选择受精且无明显不规则分裂（如，不对称、囊泡形成）或破损的鱼卵进行试验。如果试验用鱼卵为n，则取总数为2n的鱼卵进行镜检，挑选出合格受精卵（x）备用，并计算其百分率（ $x/2n*100\%$ ）。

7.3 试验用水和试验条件

任何宜于稀有鮕鲫长期存活和生长的水均可作为试验用水，且试验期间水质应维持恒定。推荐硬度（以 CaCO_3 计）范围为 $100\text{ mg/L}\sim 300\text{ mg/L}$ 。试验前，试验用水需连续曝气至氧饱和，恒温 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。试验用水的pH为6.5~8.5，试验期间变化不超过1.5个单位。如pH无法维持在这个范围内，在试验开始前调节样品贮备液的pH值，调节pH值时不能使受试物浓度明显改变，或发生化学反应或样品沉淀。推荐使用盐酸（HCl）和氢氧化钠（NaOH）来调节。

7.4 试验容器

使用玻璃或聚苯乙烯制成的试验容器（如，每孔容积为2.5 mL-5 mL的24孔板）。如样品对聚苯乙烯有吸附作用，应采用惰性材料（玻璃）制成的容器。试验容器在培养箱中的位置应随机摆放。

7.5 能力验证

实验室应建立内部质量控制范围，采用参比物3,4-二氯苯胺每年最好进行2次试验，用于验证试验鱼卵的敏感性；若试验频率很低，则可在受试物测试时同时进行。

7.6 受试物的制备

7.6.1 通过稀释贮备液的方法来配制所需浓度的试验溶液。贮备液的配制宜采用机械方式（如，搅拌或超声）使受试物在试验用水中简单的混和或搅动。对于难溶于水的受试物，可采用饱和溶液（饱和溶解度）获得合适的贮备液。应避免使用溶剂，当某些情况下需要使用溶剂时，应制备受试物溶剂贮备液。使用溶剂时，应增设助溶剂对照组，且所有试验容器中的溶剂浓度应相同，并不应超过100 μL/L。

7.6.2 流水式试验系统应具备连续分配和稀释受试物贮备液的系统（如，计量泵、稀释仪、混合系统）。试验期间，每天定时检查贮备液和试验用水的流速。

7.6.3 半静态试验系统中，试验溶液的更新频率取决于受试物的稳定性。受试物浓度不稳定（如，超过配制浓度的±20%或低于初始实测浓度的80%），应采用流水式试验系统。

8 试验程序

8.1 参照 OECD 化学品测试导则 No. 236（2013）的技术要求进行测试。以下操作以 24 孔板为例，如采用其它试验容器，相关操作应做适当调整。

8.2 预试验

8.2.1 用以确定正式试验所需浓度范围，可选择较大范围的浓度系列，如100 mg/L、10 mg/L、1 mg/L、0.1 mg/L。每个浓度组放入10个胚胎，另放入2个胚胎作为板内质控（每孔1个）。同时设置1个空白对照组，如使用了溶剂，应增设溶剂对照组。试验时间为96 h。

8.2.2 至少在试验开始前24 h，对试验容器进行试验溶液预处理。

8.2.3 每24 h观察记录1次胚胎死亡数和其它可观察效应。从48 h开始，每24 h记录1次对照组和样品组胚胎孵化数。

8.2.4 如一次预试验结果无法确定正式试验所需的浓度范围，应调整浓度范围再次进行预试验。

8.3 限度试验

8.3.1 采用本标准时，进行实测浓度（有效成分）至少为 100 mg/L 或试验体系下样品饱和溶解度的限度试验，以证明 96 h LC₅₀ 是否大于试验所采用的浓度。试验程序按 8.4 内容进行。

8.3.2 如果试验浓度下胚胎死亡率超过空白对照组（或溶剂对照组）10%，则按 8.4 进行正式试验。试验期间，还应记录其它可观察效应。如空白对照组（或溶剂对照组）死亡率超过 10%，则试验无效，应重新开展限度试验。

8.4 正式试验

8.4.1 根据预试验，在包括使稀有鮑鲫胚胎全部死亡的最低浓度与 96h 稀有鮑鲫胚胎全部存活的最大浓度之间至少设置 5 个浓度组（尽可能包括这两个浓度），并以几何级数分布。浓度间隔系数应≤2.2。每个浓度组放入 20 个胚胎，另放入 4 个胚胎作为板内质控（每孔 1 个）。同时设置 1 个空白对照组，如使用了溶剂，应增设溶剂对照组。试验时间为 96 h。

8.4.2 至少在试验开始前 24 h，对试验容器进行试验溶液预处理。

8.4.3 每 24 h 观察记录 1 次胚胎死亡数和其它可观察效应。从 48 h 开始，每 24 h 记录 1 次对照组和样品组胚胎孵化数。

8.4.4 在静态试验系统和流水式试验系统中，至少试验开始和结束时，测定对照组和最高浓度组的 pH、硬度和电导。在半静态试验系统中，至少在试验开始和结束时测定对照组和最高浓度组的硬度和电导，试验期间每次更新前后测定对照组和最高浓度组的 pH。在试验结束时，测定空白对照组和最高浓度组存活胚胎的溶解氧浓度。试验期间，每日测定 1 次温度，测定温度时，应至少随机选取 3 个试验容器进行测定。

8.4.5 在静态试验系统和流水式试验系统中，在试验开始和结束时，测定所有试验组中的受试物浓度。在半静态试验系统中，在试验开始、每次更新前后及试验结束时测定所有试验组中的受试物浓度。为获得足够体积的试验溶液进行浓度分析，各试验组设置 1 个额外的平行容器用于取样，该容器所有条件与试验容器完全一致（材质、溶液体积/表面积，暴露条件等，但不放胚胎）。当浓度不在配制浓度的 80%-120% 范围内时，应采用测量浓度的几何平均值表示效用浓度。

8.5 暴露条件

- a) 试验开始：鱼卵受精后尽快开始试验，胚胎应最晚在 16 细胞期（约为受精后 115min）前暴露于试验溶液中；
- b) 试验结束：暴露 96 h 后；
- c) 试验溶液：试验前在已预处理 24 h 的 24 孔板中，每孔注入 2 mL 新鲜制备的试验溶液；
- d) 温度：(26±1)℃；
- e) 光照周期：12 h：12 h。

8.6 胚胎分配（以 24 孔板为例，参见附录 B）

- f) 受试物组各浓度 20 个胚胎/板；
- g) 溶剂对照组 20 个胚胎/板（如需要）；
- h) 以试验用水为介质，在上述各板中另放入 4 个胚胎作为板内质控；
- i) 空白对照组 24 个胚胎/板。

8.7 观察

8.7.1 每个试验胚胎每 24 h 观察以下几个终点：卵凝结、体节未形成、尾部未与卵黄囊分离、无心跳（见表 1），如观察到上述表征即可判定死亡。

8.7.2 卵凝结：凝结的胚胎呈乳白色，在显微镜下观察呈黑色，可分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察。

8.7.3 体节缺失：在 (26±1)℃ 条件下，正常发育的胚胎在 24 h 后会形成大约 20 节体节。体节发育正常的胚胎会有自主运动（来回收缩），自主运动的出现可表明胚胎体节发育成型。体节缺失可分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察。如暴露 24 h 后体节未形成，可归因于发育迟缓；如 48 h 后仍未形成，可判定死亡。

8.7.4 尾部未分离：正常发育的胚胎，在其身体后部伸长后可观察到尾部与卵黄囊分离的现象。尾部未分离可分别在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 观察。

8.7.5 无心跳：在 26℃±1℃ 条件下，正常发育的胚胎在 48 h 后会有心跳。记录该终点时应特别注意，心率不齐或有心跳但腹部无血液循环均不能判定胚胎死亡。判定胚胎无心跳，应至少在放大 80 倍条件下观察持续 1min 或以上。无心跳可分别在 48 h、72 h 和 96 h 观察。

8.7.6 从 48 h 开始至试验结束时，每日观察记录 1 次所有试验组的孵化率。

表 1 胚胎急性毒性试验观察终点

观察终点	暴露时间 (h)			
	24	48	72	96
卵凝结	+	+	+	+
体节缺失	+	+	+	+
尾部未分离	+	+	+	+
无心跳	/	+	+	+

注：“+”表示在该时刻可能观察到的终点；“/”表示不适用。

9 质量控制

- a) 试验用胚胎总受精率≥70%；

- b) 试验期间，试验容器中温度维持在 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 之间；
- c) 试验结束时，空白对照组（溶解对照组，如有）胚胎存活率 $\geq 90\%$ ；
- d) 试验结束时，空白对照组（溶解对照组，如有）胚胎孵化率 $\geq 80\%$ ；
- e) 试验结束时，空白对照组和最高浓度组试验溶液的溶解氧含量 $\geq 80\%$ 空气饱和值。

10 数据与报告

10.1 数据处理

10.1.1 每个试验孔可作为独立平行参与统计分析。选择合适的统计软件计算出48 h和/或96 h的 LC_{50} 值，及其95%的置信限。

10.1.2 如果试验数据不适用标准方法计算 LC_{50} 值，可用不产生死亡的最高浓度和产生100%死亡的最低浓度估算 LC_{50} 近似值，即这两个浓度的几何平均值。

10.1.3 当进行限度试验时，直接报告限度试验使用的浓度，并说明 LC_{50} 大于限度试验所采取的浓度。

10.2 试验报告

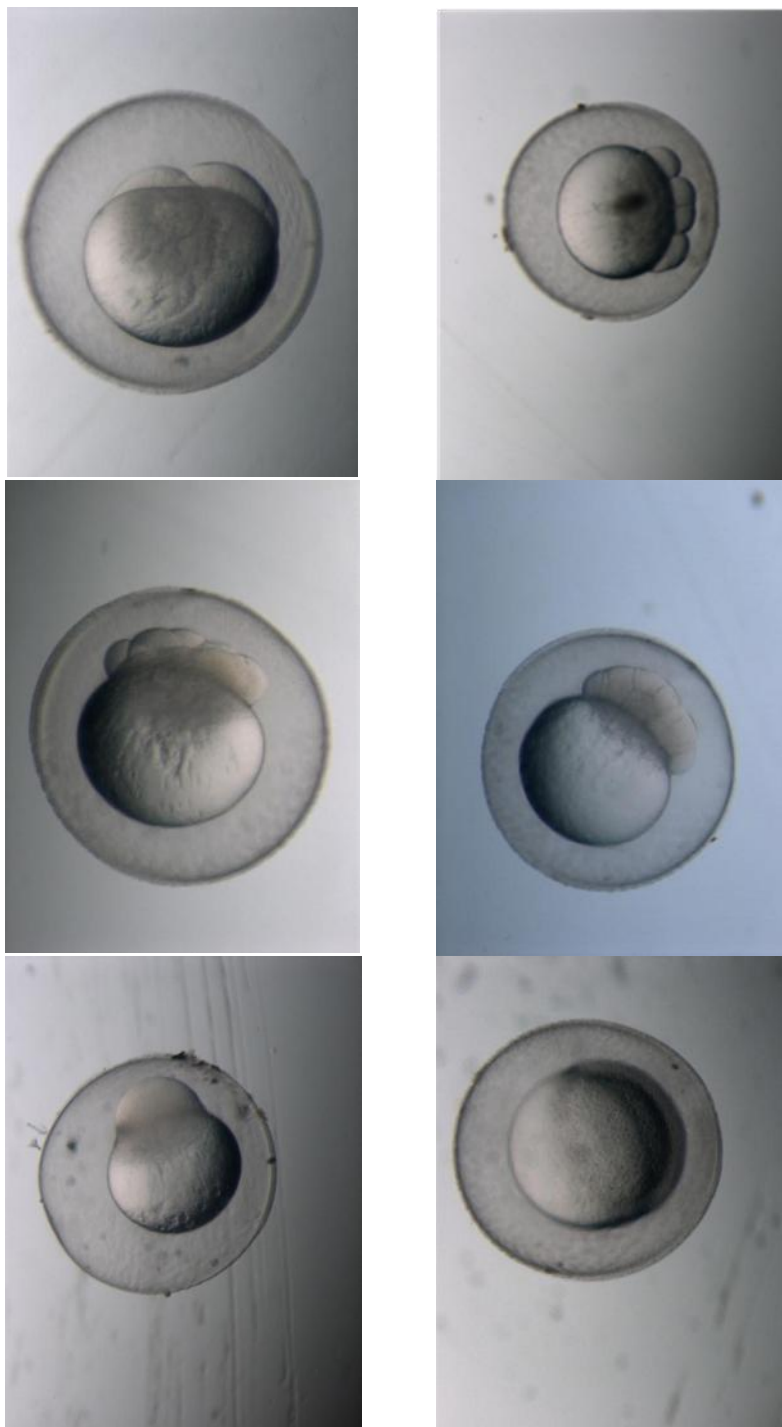
试验报告应至少包括试验名称、目的、试验原理、试验的准确起止日期及下述内容：

- a) 受试物
物理性质及相关理化特性、基础信息（如：分子量、化学结构式、纯度、CAS号等，见第4节）等。
- b) 稀有鮎鲫
规格、来源、健康状况、驯养情况以及受精卵收集方法和操作过程等。
- c) 试验条件
 - 试验方式：静态、半静态或流水式；
 - 试验设计：试验容器数、试验浓度和平行数、每个容器中的胚胎数；
 - 贮备液和试验溶液的配制方法和更新频率（如使用溶剂，给出其化学名和浓度）；
 - 试验配制浓度、实测浓度及标准差、受试物水溶液中的分析方法；
 - 试验用水特征：来源、类型、pH值、硬度、温度、溶解氧及其它测定数据；
 - 试验容器中的水质：pH值、硬度、温度、电导率和溶解氧；
- d) 试验结果
 - 对照组存活率；
 - 胚胎总体受精率（计算方法）；
 - 受试物组及对照组孵化率；
 - 试验期间，无死亡发生的最高浓度；
 - 试验期间，导致100%死亡的最低浓度；
 - 24 h、48 h、72 h、96 h时的每个浓度的累计死亡率；
 - 48 h（如有）和96 h的 LC_{50} ，及其95%的置信限（如有）；
 - 浓度-死亡率曲线图；
 - 对照组死亡率（空白对照、板内质控及溶剂对照）；
 - 4个可观察终点的数据；
 - 由受试物引起的各种异常现象描述；
 - 确定 LC_{50} 值的统计学方法（点估计、回归模型及用于计算 LC_{50} 的几何平均值）；
 - 试验期间，可能会影响试验结果的隐患；
- e) 结果讨论。

附 录 A

(资料性)

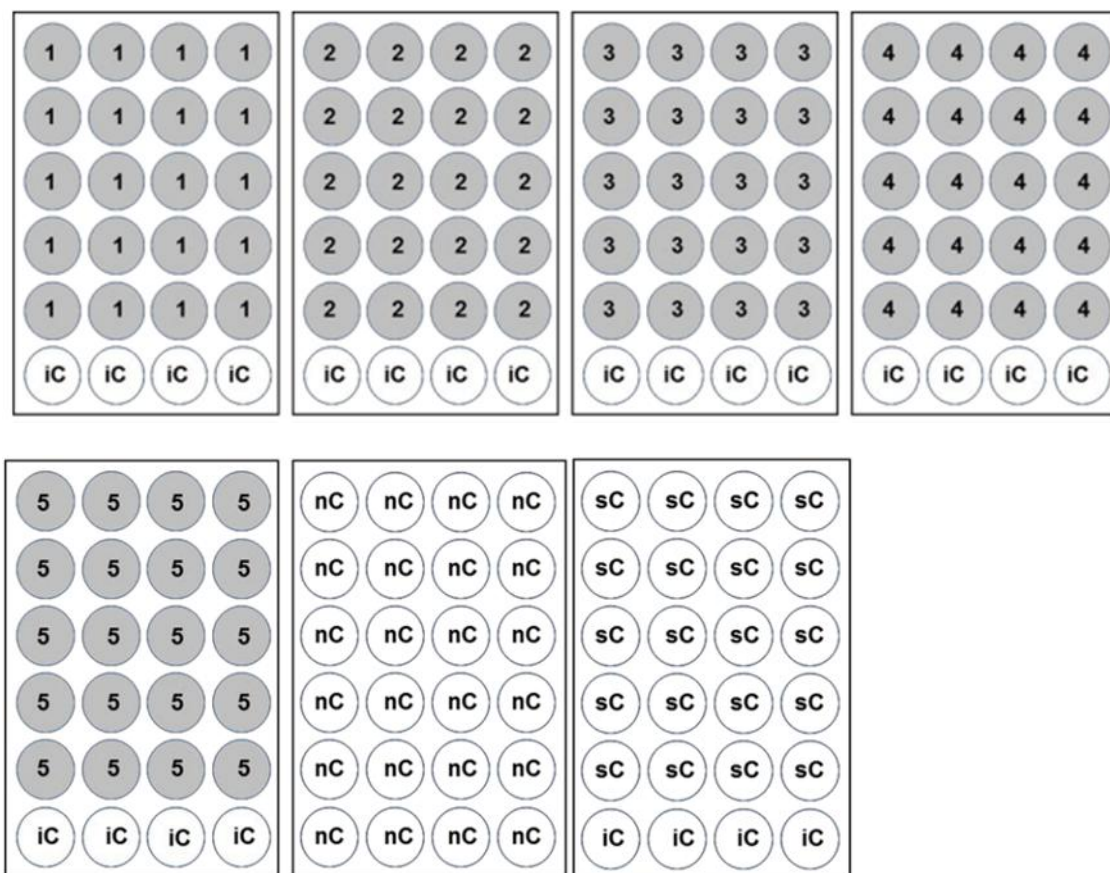
稀有鮡鲫 (*Gobiocypris rarus*) 胚胎的正常发育图 ($25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$)



注：1. 0.75h, 2细胞期；2. 1.58h, 8细胞期；3. 1.92h, 16细胞期；4. 2.42h, 32细胞期；5. 4.5h, 囊胚早期；6. 8.25h, 原肠胚早期（50%外包期）。

附录 B
(资料性)

24 孔板布局图



注：1-5：5个试验浓度样品组；nC：空白对照组（试验用水）；iC：板内控制（试验用水）；sC：溶剂对照组（如有）。

参 考 文 献

- [1] ISO (2007) International Standard Water quality – Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.
- [2] OECD Series on Testing and Assessment Number 23(Second Edition). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Paris: OECD, 8 February,2019.
- [3] FRANCOIS B, RUBEN S, JANE M R, et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2014, 69: 496-511.
- [4] OECD series on testing and assessment. No. 157 validation report (Phase 1) for the zebrafish embryo toxicity test [R]. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2011.
- [5] OECD series on testing and assessment. No. 179 validation report (Phase 2) for the zebrafish embryo toxicity test [R]. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development, 2012.
- [6] 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(2):97-103.
-