

CAQI

团 体 标 准

T/CAQI XXXX—XXXX

工业废盐综合毒性评估技术指南

Technical guidelines on comprehensive toxicity assessment of industrial waste salt

（征求意见稿）

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

中国质量检验协会 发布

目 次

前言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 原理..... 4

5 试剂与仪器设备..... 4

 5.1 试剂 4

 5.2 仪器、设备 5

6 样品..... 5

 6.1 样品的采集和保存 5

 6.2 样品预处理 5

 6.3 污染物提取 5

7 试验步骤..... 6

 7.1 试验类型选择..... 6

 7.2 预实验与试验浓度确定..... 6

 7.3 成组生物毒性试验..... 6

 7.4 对照试验..... 7

8 试验数据处理 7

9 试验报告 7

附录 A（资料性） 工业废盐生物毒性测试样品前处理方法 8

 A.1 概述..... 8

 A.2 试剂和材料..... 8

 A.3 仪器装备..... 8

 A.4 操作步骤..... 8

 A.5 质量控制..... 9

参考文献 0

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。

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。

本文件由南京华工创新研究院有限公司和南京大学共同提出。

本文件由中国质量检验协会归口。

本文件起草单位：南京华工创新研究院有限公司、南京大学、南京理工大学、南京大学宜兴环保研究院、重庆大学

本文件主要起草人：

工业废盐综合毒性评估技术指南

1 范围

本文件确立了工业废盐综合毒性测定的工作流程，规定了样品采集、样品制备、试验步骤及试验数据处理等阶段的操作方法。

本文件适用于工业生产伴生废盐在无害化处置、资源化再生、回用途径筛选及最终排放过程中所需的工业废盐综合毒性测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 35517 化学品 鱼类生殖毒性短期试验方法

HJ/T 20 工业固体废弃物采样制样技术规范

HJ 1069 水质 急性毒性的测定 斑马鱼卵法

ISO 10872 水和土壤质量 测定沉积物和土壤样品对秀丽隐杆线虫（线虫）生长、生育和生殖的毒性作用（Water and soil quality — Determination of the toxic effect of sediment and soil samples on growth, fertility and reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda)）

ISO 13829 水质 水和废水基因毒性测定 Umu试验（Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

工业废盐 industrial waste salt, IWS

工业生产过程或废水处理过程产生的含有毒有害成分的固体废盐。

3.2

综合毒性 comprehensive toxicity

复杂环境介质（如工业废盐等）中全部或大部分污染物共同接触引起生物体产生的复合毒性效应。

3.3

急性毒性 acute toxicity

生物一次或24 h内多次给予受试品后，在短时间内所产生的毒性反应。

3.4

生殖/发育毒性 reproductive and developmental toxicity

受试品对生物生殖功能、胚胎形态（致畸性）以及幼体发育有害影响。

3.5

遗传毒性 genotoxicity

受试品对原核或真核细胞、或实验生物产生的可遗传性的基因突变、染色体结构畸变及其他脱氧核糖核酸（DNA）或基因变化。

3.6

阴性对照物 negative control material

已知在生物毒性测试中不产效应的材料或物质。

3.7

参比物质 reference substance/material
测试中，用于验证方法敏感性的已知阳性对照物质。

3.8 **毒性当量** toxic equivalent quantity, TEQ
将待测样品测得的毒性值转换为可产生同等毒性效应的参比物质当量浓度。

3.9 **生物等效浓度** biological equivalence concentration, BEQ
在生物毒性测试中，与待测样品测得毒性大小相等的参比物质浓度。

4 原理

通过添加适当的溶剂将待测样中所包含的全部或大部分污染物洗脱出，制得预处理样品，随后采用相互补充的一组生物毒性测试评价待测样品对受试生物正常生理活动的影响程度，以达到较为全面地认识待测样的生物毒害效应, 如急性毒性、生殖/发育毒性及遗传毒性。基于毒性当量理论，通过计算将测得的毒性数值转换为参比物质的BEQ，用于量化反映待测样品中有害污染物综合诱导的生物毒性。整个工业废盐综合毒性测定流程概括为样品采集、样品制备、毒性试验及数据处理4个部分（如图1）。

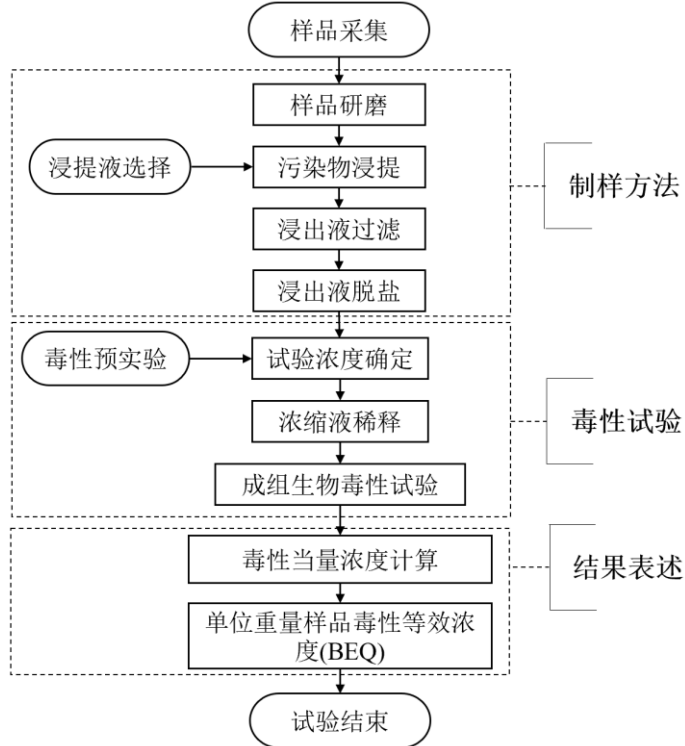


图1 工业废盐综合毒性测定流程

5 试剂与仪器设备

样品处理所需试剂与仪器设备参照5.1和5.2，毒性试验中所用试剂与仪器设备参照7.3表1。

5.1 试剂

- 5.1.1 纯水：满足 GB/T 6682 所规定 II 级实验室纯水
- 5.1.2 冰醋酸（CH₃CH₂OOH）：优级纯
- 5.1.3 氢氧化钠（NaOH）：优级纯
- 5.1.4 盐酸（HCl）：优级纯

5.1.5 浸提液#1：将 5.7 mL 冰醋酸加入 500 mL 纯水中，随后加入 64.3 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液，最后稀释至 1L， $\text{pH}=4.93\pm0.05$

5.1.6 浸提液#2：将 5.7 mL 冰醋酸稀释至 1L， $\text{pH}=2.88\pm0.05$

5.2 仪器、设备

5.2.1 烧杯及容量瓶：500 mL、1L

5.2.2 表面皿

5.2.3 分样筛：涂 Teflon 的筛网，孔径 9.5 mm

5.2.4 研磨机

5.2.5 pH 计：在 25°C 时，精度为 ± 0.05 pH

5.2.6 天平：精度为 ± 0.01 g

5.2.7 磁力搅拌器

5.2.8 微孔滤膜：0.45 μm

5.2.9 真空过滤器或正压过滤器

6 样品

6.1 样品的采集和保存

按照 HJ/T 20 进行采样前的相关背景调查和现场踏勘，设计采样方案，确定采样对象、份样数、份样量、采样时间、频次、采样方法及样品保存方式。

6.2 样品预处理

使用分样筛筛分并收集粒度小于 9.5 mm 待测工业废盐样品。对于粒度大于 9.5 mm 的样品，采用研磨机进行破碎，用于后续制样。

6.3 污染物提取

6.3.1 浸提液的选择

6.3.1.1 称取 5.0 g 破碎后的工业废盐样品，转移至 500 mL 烧杯中，加 96.5 mL II 级实验室纯水，在磁力搅拌器上充分搅拌 5 min，测定其 pH。

6.3.1.2 根据 6.3.1.1 中 pH 测定结果选择浸提液：

——若 $\text{pH}<5.0$ ，选择浸提液#1 用于该工业废盐样品中污染物的浸提；

——若 $\text{pH}\geq 5.0$ ，向浸提液中加入 3.5 mL 浓度为 1 mol/L 的 HCl 溶液，并加热至 50 °C，持续 10 min，待冷却至室温后测定 pH，若 $\text{pH}<5.0$ 选择浸提液#1，若 $\text{pH}\geq 5.0$ 选择浸提液#2。分析过程如图 2 所示。

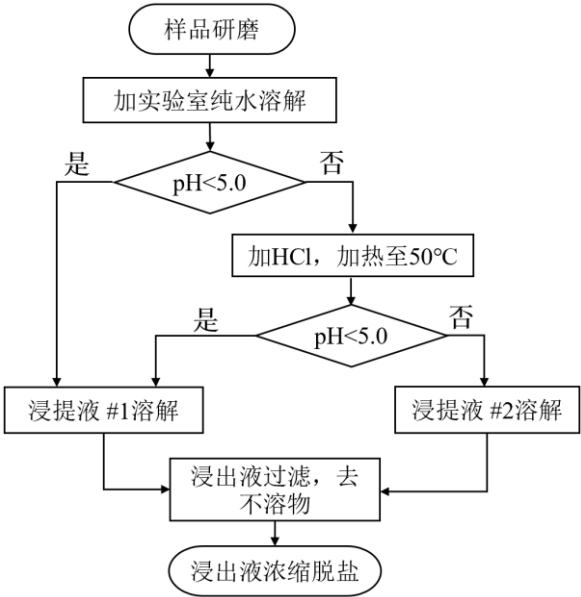


图2 制样过程

6.3.2 污染物浸提

浸提液类型确定后，进行污染物浸提。1 g工业废盐样品中宜加入10 mL浸提液（#1或#2）。浸提液与目标工业废盐混合后，盖上表面皿，置于磁力搅拌器上持续浸提16~20 h，推荐转速为（30±2）rpm/min。

6.3.3 浸出液过滤

在压力过滤器上装好滤膜，用浸提液（#1或#2）淋洗过滤器和滤膜，弃掉淋洗液，将6.3.2中获得的浸出液在装置上进行过滤并收集，于4℃下保存待用。

6.3.4 浸出液脱盐

结合评价目标，确定适宜的浸出液脱盐方法。需综合关注工业废盐样本中全部可溶性污染物（含无机物与有机物）所引起的毒害效应时，应采取旋转蒸发法将6.3.3制得的浸出液中原有溶剂充分去除，并将残渣重溶于1 mL实验室纯水，必要时可添加10%二甲基亚砜（生物技术级）帮助溶解。仅关注有机污染物的综合毒害效应时，可采用固相萃取法对其中的有机污染物进行富集浓缩，以去除待测样品中的高盐含量对生物毒性测试的影响，固相萃取法前处理所需材料与试剂，仪器设备及操作步骤参见附录A。

7 试验步骤

7.1 试验类型选择

根据目的选择试验类型，推荐选取的试验类型包含急性毒性、生殖毒性、发育毒性及遗传毒性等。

7.2 预实验与试验浓度确定

将经6.3.4脱盐处理获得浓缩液稀释不同倍数，获得3个或以上不同浓度的样点，按照7.3所述方法进行毒性预试验，根据评价目的及试验方法要求确定适宜的浓度进行正式试验。

7.3 成组生物毒性试验

宜选择斑马鱼胚胎毒性试验、鱼类生殖毒性短期试验、线虫毒性测试及Umu等试验等方法测定待测样品的急性毒性、生殖/发育毒性及遗传毒性。参照7.2结果，将6.3.4所获待测样品稀释至目标浓度进行测试，各试验方法参见表1。

表1 工业废盐综合毒性试验方法

毒性终点	检测指标	试验方法	试验方法标准编号	参比物质
急性/发育毒性	24 h、48 h死亡率	斑马鱼胚胎毒性试验	HJ 1069	3, 4-二氯苯胺
生殖毒性	卵黄蛋白原测定	鱼类生殖毒性短期试验	GB/T 35517	醋酸铅
生殖/发育毒性	体长、子代数	线虫毒性试验	ISO 10872	十六烷基二甲基苄基氯化铵
遗传毒性	DNA损伤修复	Umu试验	ISO 13829	4-硝基喹啉-N-氧化物

7.4 对照试验

单次测试需同时设置阴性对照和阳性对照。
——阴性对照：生物生长所需培养基。
——阳性对照：参比物质，见表 1。

8 试验数据处理

试验的结果以参比物质的等效浓度来量化表述待测样品的综合毒性大小。按照表1所示相应标准，对各生物毒性测试原始数据进行处理，通过标准曲线法，将待测样品毒性测试值转换为参比物质的TEQ，随后计算单位质量工业废盐的BEQ。工业废盐样本在6.3中经浸提液处理获得浸出液，浸出液中工业废盐溶解浓度计算见公式（1）。浸出液在7.3中经浓缩/稀释后用于综合毒性测试，单位质量工业废盐综合毒性的生物等效浓度计算见公式（2）。

$$C_d = \frac{W_{iws}}{V} \dots\dots\dots (1)$$

式中：
 C_d ——工业废盐溶解浓度，mg/L；
 W_{iws} ——工业废盐重量，mg；
 V ——污染物浸提时所用浸提液体积，L。

$$BEQ_{RC} = \frac{TEQ}{REF \times C_d} \dots\dots\dots (2)$$

式中：
 BEQ_{RC} ——单位质量工业废盐综合毒性（以生物等效浓度计），mg/L；
 TEQ ——待测样品在生物毒性测试中测得的毒性当量，mg/L；
 REF ——待测样品用于毒性测试时相对于6.3所获浸提液的浓缩倍数或稀释倍数的倒数；
 C_d ——工业废盐的溶解浓度（见公式（1）），mg。

9 试验报告

试验报告要求包括但不限于以下几个信息：
——样品的名称、外观特征、来源、保存方法及保存时间，
——样品前处理方法、测试样品浓度、试验类型、试验名称，
——阴性对照、阳性对照异常情况及其他，
——成组毒性测试的结果。

附 录 A
(资料性)
工业废盐生物毒性测试样品前处理方法

A.1 概述

本方法用于工业废盐预处理样本用于生物毒性测试前的有机物污染物富集，以达到去除盐等干扰基质的目的。为保障固相萃取法的进行，首先需对待测样品进行过滤，去除悬浮物的影响，并调节pH使得待测品处于最佳状态。

A.2 试剂和材料

A.2.1 超纯水调节液：调节GB/T 6682一级超纯水，使其pH=2~3

A.2.2 二甲基亚砜：细胞培养级

A.2.3 甲醇：色谱纯

A.2.4 正己烷：色谱纯

A.2.5 二氯甲烷：色谱纯

A.2.6 氢氧化钠溶液：0.1 mol/L，分析纯

A.2.7 盐酸溶液：0.1 mol/L，分析纯

A.2.8 微孔滤膜，0.22 μm、0.45 μm

A.2.9 固相萃取柱：Oasis HLB柱¹⁾

A.3 仪器装备

A.3.1 真空循环水泵

A.3.2 砂芯过滤套件

A.3.3 固相萃取仪

A.3.4 氮吹仪

A.4 操作步骤

A.4.1 待测样品过滤

采用0.45 μm微孔滤膜对待测样品进行过滤。

A.4.2 待测样品pH调节

用氢氧化钠溶液或盐酸溶解调节待测品pH=2。

A.4.3 固相萃取柱活化

依次用5 mL正己烷和二氯甲烷混合液（体积比1:1）和5 mL甲醇活化HLB柱。

A.4.4 HLB柱平衡

使用5 mL A.2.1超纯水调节液对小柱进行平衡。

A.4.5 待测样品过柱

开启真空装置，使待测样品在真空压下以1~2滴/秒的流速过柱。

1) HLB 是由美国沃特世公司提供的产品的商品名。给出这一信息是为了方便本文件使用者，并不表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，那么可使用这些等效产品。

A.4.6 洗脱

待全部待测样品流过HLB柱，关闭真空装置，加5 mL A.2.1超纯水调节液去除无机盐离子，再依次用10 mL 正己烷和二氯甲烷混合液（体积比1:1）和10 mL 甲醇洗脱吸附在HLB柱上的有机污染物。

A.4.7 待测样品浓缩

将洗脱液在温和的氮气流下吹至近干，加入1 mL 10%的二甲亚砷（质量分数）复溶，然后过0.22 μm 滤膜并转移至1 mL棕色色谱小瓶，储存在-20°C直至分析。

A.5 质量控制

以纯水作为空白对照，按A.4步骤和待测样品进行同样的操作与处理。

参 考 文 献

- [1]. GB/T 16886.3 医疗器械生物学评价 第 3 部分：遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验
 - [2]. GB 30000.18 化学品分类和标签规范 第 18 部分：急性毒性
 - [3]. GB 31574 再生铜、铝、铅、锌工业污染物排放标准
 - [4]. ISO 23196 水质 生物等效浓度的计算（Water quality — Calculation of biological equivalence (BEQ) concentrations）
 - [5]. 生态环境部，《危险废物环境管理指南 化工废盐》，2021.12
 - [6]. 张瑛等，某石化废水的综合毒性评价及其处理工艺对毒性的削减规律研究 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12(05): 109-18.
 - [7]. RAO K et al. Fish forewarning of comprehensive toxicity in water environment based on Bayesian sequential method [J]. Journal of Environmental Sciences, 2021, 110: 150-9
-