

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx—xxxx

化学农药 土壤代谢试验准则

Chemical pesticide—Guideline for soil metabolism test
(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准负责起草单位：

本标准主要起草人：

化学农药 土壤代谢试验准则

1 范围

本标准规定了化学农药土壤代谢试验的概述、仪器与试剂、被试物与参照物、试验用土壤、试验条件、被试物添加、采样与检测、数据处理、质量控制以及试验报告等的基本要求。

本标准适用于挥发性较小或不具有挥发性的农药，不适用于不能在试验条件下保持在土壤中的极易挥发的农药。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 32723 土壤微生物生物量的测定 底物诱导呼吸法

GB/T 32726-2016 土壤质量-野外土壤描述

NY/T 1121.2 土壤检测 第2部分：土壤 pH 的测定

NY/T 1121.4 土壤检测 第4部分：土壤容重的测定

NY/T 1121.5 土壤检测 第5部分：石灰性土壤阳离子交换量的测定

NY/T 1121.6 土壤检测 第6部分：土壤有机质的测定

NY/T 1121.21 土壤检测 第6部分：土壤最大吸湿量的测定

NY/T 2882.1-2016 农药登记 环境风险评估指南 第1部分：总则

NY/T 3150-2017 农药登记 环境降解动力学评估及计算指南

LY/T 1225 森林土壤颗粒组成(机械组成)的测定

ISO 11274 土壤质量 持水能力的测定 实验室方法 (Soil quality - Determination of water-retention characteristic - Laboratory methods)

ISO 14240-2 土壤质量 土壤微生物生物量的测定-熏蒸提取法 (Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

代谢物 metabolite

降解产物 degradation product

供试物因生物降解或非生物降解产生的所有物质，包括二氧化碳、生物合成物和结合残留物质。

[NY/T 2882.1-2016, 定义 3.13]

3.2

主要代谢物 major metabolite

主要降解产物 major degradation product

在土壤、水和沉积物的降解试验中，在任何一次检测时间点中摩尔分数或放射性强度比例大于10%的代谢物。

[NY/T 2882.1-2016, 定义 3.14]

3.3

结合残留 bound residues

用不改变其化学结构的方法不能萃取出的残留物。

[NY/T 3150-2017, 定义 3.3]

3.4

已萃取残留 extracted residues

已从土壤中萃取出的残留物。

3.5

未萃取残留 unextracted residues

未从土壤中萃取出的残留物。

3.6

50%消失时间 50% disappearance time

供试物消失至初始物质质量的50%所需的时间，用 DT_{50} 表示。当明确消失的过程仅为降解时，可表示为 $DegT_{50}$ ；当消失的过程为消散时，可表示为 $DisT_{50}$ 。

[NY/T 3150-2017, 定义 3.4]

3.7

90%消失时间 90% disappearance time

供试物消失至初始物质质量的90%所需的时间，用 DT_{90} 表示。

[NY/T 3150-2017, 定义 3.7]

3.8

矿化 mineralisation

有机物在好氧条件下完全降解为二氧化碳和水或在厌氧条件下完全降解为甲烷、二氧化碳和水的过程。本标准中，当使用 ^{14}C 标记的被试物时，矿化指被标记碳原子被氧化并释放出二氧化碳的过程。

3.9

放射化学纯度 radiochemical purity

放射性标记化合物中以某种特定的化学形态存在的放射性核素的活度占总放射性核素活度的百分比。

3.10

质量活度 massic activity

比活度 specific activity

样品的放射性活度除以该样品的总质量。

注：单位为贝克勒尔每千克（Bq/kg）或微居里每毫克（ $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ）， $1\mu\text{Ci}/\text{mg}=3.7\times 10^{10}\text{Bq}/\text{kg}$ 。

4 试验概述

将被试物添加至土壤中，在恒定的温度和土壤水分含量的条件下避光培养，用适当的吸收装置收集挥发性产物。定期取样提取和检测土壤和吸收装置中的母体和代谢物，明确矿化率、结合残留和质量平衡回收率，确定主要代谢物、计算母体和主要代谢物的 DT_{50} 和 DT_{90} 。

5 仪器与试剂

5.1 仪器

5.1.1 气体流动培养装置（参见附录 A 的图 A.1）或二氧化碳测定培养装置（参见附录 A 的图 A.2）。

5.1.2 定性定量分析仪器，如气相色谱仪、高效液相色谱仪、质谱仪、气相色谱-质谱联用仪、高效液相色谱-质谱联用仪、核磁共振仪等。

5.1.3 液体闪烁计数仪。

5.1.4 氧化燃烧仪。

5.1.5 离心机。

5.1.6 提取、浓缩设备。

5.2 试剂

除另有规定外，所有试剂均为分析纯。

5.2.1 氢氧化钠（NaOH，1310-73-2），2mol/L。

5.2.2 硫酸（ H_2SO_4 ，7664-93-9），0.05mol/L。

5.2.3 乙二醇（ $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ ，107-21-1）。

5.2.4 碱石灰（氢氧化钙与氢氧化钠或氢氧化钾的混合物）。

6 被试物与参照物

6.1 被试物

应使用同位素标记的被试物，宜使用 ^{14}C 标记。标记的位置应在化合物的最稳定部分。对含有一个环状结构的化合物，标记位点应选择在该环状结构；对含有多个环状结构的化合物，应以不同环状位置标记的化合物分别开展试验。被试物的含量和放射化学纯度应 $\geq 95\%$ 。

仅测定降解速率时，可使用同位素标记的被试物，也可使用非标记的被试物。

试验开始前，应了解被试物的以下信息：

- 水中溶解度；
- 有机溶剂中的溶解度；
- 饱和蒸汽压；
- 正辛醇/水分配系数；
- 在黑暗条件下的化学稳定性（水解）；
- 解离常数（对于易质子化或去质子化的被试物）；
- 土壤微生物毒性（如有）；
- 被试物及其代谢物的定性和定量分析方法（包括提取和净化方法）。

6.2 参照物

农药母体和代谢物的标准物质，不需同位素标记。

7 试验用土壤的选择、采集、处理和保存

7.1 土壤的选择

应使用 4 种能代表农药使用区域的土壤，4 种土壤的有机碳含量、pH 值、粘粒含量和微生物量应有一定差异。土壤的理化性质宜满足以下要求：

- 土壤质地为砂质壤土、粉壤土、壤土或壤质砂土；
- 土壤 pH 值为 5.5~8.0；
- 土壤有机碳含量为 0.5%~2.5%；
- 土壤微生物生物量 $>$ 土壤总有机碳的 1%。

7.2 土壤的采集

4 年内使用过被试物或与被试物结构类似农药的土壤不应用于试验。

应采集 A 发生层（按 GB/T 32726-2016 附录 C 确定）或土壤表层 20 cm 的土壤。除水稻土外，应避免采集以下土壤：

- 处于干旱、冰冻条件的土壤或被水覆盖的土壤；
- 刚刚结束长期（ >30 d）干旱、冰冻条件或长期被水覆盖的土壤。

应记录采集区的地理位置、植被、农药和肥料使用情况及其他污染情况。

7.3 土壤的运输与处理

土壤样品在运输过程中应尽量保持土壤含水量不发生变化，并置于黑暗通风处。可使用聚乙烯袋储存，但袋口不宜系紧。

土壤采集后应尽快处理。先去除较大的动植物残体和石块，然后过 2 mm 筛。过筛前不应过分干燥或碾压土壤。

7.4 土壤的保存

宜使用新鲜土壤开展试验，必须保存时，采用以下保存方式：

——将土壤储存于温室中，并种植植物；

——将已处理过的土壤置于 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下，最长保存 3 个月。

7.5 土壤性质的测定

至少应测定试验用土壤的质地（砂粒、粉粒和粘粒的比例）、pH 值、阳离子交换量、总有机碳、容重、持水能力或饱和持水量（最大吸湿量），好氧培养条件下的代谢试验还应测定土壤微生物量。

土壤质地按 LY/T 1225 测定。

pH 值按 NY/T 1121.2 测定。

阳离子交换量按 NY/T 1121.5 测定。

总有机碳按 NY/T 1121.6 测定。

土壤容重按 NY/T 1121.4 测定。

土壤持水能力按 ISO 11274 测定。

饱和持水量按 NY/T 1121.21 测定。

土壤微生物生物量宜按 ISO 14240-2 测定，也可按 GB/T 32723 测定。

7.6 土壤预培养

试验开始前，土壤应先进行预培养，预培养期间温度与湿度应与试验条件一致。预培养期间应去除发芽的种子。预培养时间为 2 d~28 d，土壤储存与预培养的总时间不应超过土壤保存期限。对于水稻土培养条件和水稻土厌氧培养条件，预培养时间应>2 周。

8 试验条件

8.1 温度

整个试验周期内，土壤应在黑暗、恒温条件下培养，试验温度宜为 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。如用同种土壤在 $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下开展平行试验可按 NY/T 3150 附录 C 计算该被试物的 Q_{10} 。

8.2 土壤水分含量

对于好氧培养条件下的代谢试验，土壤水分含量应保持在土壤最大持水量的 40 % ~ 60 % 或 pF2~

pF2.5（土壤水势为 $1 \times 10^4 \text{ Pa}$ ~ $3.3 \times 10^4 \text{ Pa}$ ）。土壤水分含量应以 $\text{g}_\text{水}/\text{kg}_\text{干土}$ （克水每千克干土壤）表示。应定期（例如每 2 周）测定培养瓶的质量并补水，补水时宜使用灭菌自来水。补水时应注意避免被试物和代谢物的挥发或光解。

对于水稻土培养条件、水稻土厌氧培养条件和厌氧培养条件下的代谢试验，应保持土壤表面有水层。

8.3 培养条件

8.3.1 好氧培养条件

使用气体流动式培养装置时，应连续或间隙通入空气；使用二氧化碳测定仪式培养装置时，通过扩散维持好氧条件。

8.3.2 厌氧培养条件

先为好氧培养条件下培养 30 d 或 DT_{50} （取二者较短者），加水至土壤表面有 1 cm ~3 cm 水层并通入惰性气体（例如 N_2 或 Ar ）。培养系统应能够测定 pH 值、溶解氧、氧化还原电位。使用二氧化碳测定仪式培养装置时，应保持密封以免空气进入。

8.3.3 无菌好氧培养条件

将土壤和被试物灭菌，并按 8.3.1 或 8.3.4 的条件培养。

8.3.4 水稻土培养条件

保持土壤表面有 1 cm~ 5 cm 的水层，宜为 5 cm。培养系统应与空气联通，并应能够测定 pH 值、溶解氧、氧化还原电位。

8.3.5 水稻土厌氧培养条件

加水至土壤表面有 1 cm ~2 cm 水层，宜为 1cm，并通入惰性气体（例如 N_2 或 Ar ）。培养系统应能够测定 pH 值、溶解氧、氧化还原电位。使用二氧化碳测定仪式培养装置时，应保持密封以免空气进入。

8.3.6 培养条件的选择

一般应进行好氧培养条件和厌氧培养条件的试验，根据农药使用方法、环境风险评估需要和委托方要求，可进行额外试验：

——进行无菌好氧培养条件的试验可获得被试物的非生物代谢信息；

——进行水稻土培养条件的试验可获得被试物在水稻田的代谢信息；

——进行水稻土厌氧培养条件的试验可获得被试物在水稻田厌氧层土壤中的代谢信息，其 DT_{50} 可用于对水生生态系统的风险评估。

8.4 试验周期

满足以下条件之一时，试验可终止：

——母体降解率 $\geq 90\%$ 、矿化率 $\geq 5\%$ ；

——已明确母体的降解及主要代谢物的生成和降解、矿化率 $\geq 5\%$ ，且试验已持续 120 d；

——试验已持续 1 年。

9 添加被试物

9.1 被试物配制方法

将被试物溶于去离子水或蒸馏水中，必要时可使用少量丙酮或其他有机溶剂助溶。有机溶剂的加入量不应显著影响土壤微生物的活性，不应使用三氯甲烷、二氯甲烷及其他卤代溶剂等对微生物具有抑制作用的溶剂。

也可将被试物与石英砂或少量风干灭菌的土壤混匀后加至试验土壤中。如使用有机溶剂，应待有机溶剂挥发后再将混有被试物的石英砂或土壤添加至试验土壤中。

9.2 被试物添加方法

每个培养瓶中添加 50 g ~ 200 g 土壤（干重），经预培养后，添加被试物，并用不锈钢铲搅拌或摇动培养瓶使被试物与土壤混匀。也可将被试物添加至 1 kg~ 2 kg 的大份土壤，并用合适的搅拌设备混合均匀后分成 50 g~ 200 g 的小份，再装入培养瓶中。

水稻土培养条件的试验，被试物应添加至水层，并应在添加被试物后将水相与土壤一起搅拌混合。水稻土厌氧培养条件的试验，被试物用注射器均匀添加至土层。

从添加过被试物的土壤中取出一小部分（如 1g）用于分析以确定被试物在土壤中分布的均匀性。

被试物用有机溶剂溶解后添加的，添加被试物后应轻轻摇动培养瓶，并在瓶口通过柔和的气流以使溶剂蒸发。使用气体流动式培养装置时，可不进行该操作。

9.3 被试物添加量

按式 1 计算被试物的添加浓度 C_{soil} 。

$$C_{soil} = \frac{AR}{L \times d \times 100} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

AR——被试物的推荐用量，单位为克每公顷（g/hm²）；

L——土层厚度，单位为厘米（cm）；

d——土壤容重，单位为克每立方厘米（g/cm³），默认值为 1g/cm³；

100——单位换算系数。

当农药施用方法为叶面喷雾或土壤喷雾时，L=2.5 cm；当农药施用方法为种子处理、沟施、穴施时，L 根据实际施药深度确定。

当式 1 计算出的浓度不足以鉴别主要代谢物时，可另设高含量的处理组，但应避免影响土壤微生物的活性。

9.4 对照组

对于好氧培养条件的试验，应同时设置未加被试物的空白对照组，与处理组在相同条件下培养，用于试验期间和试验结束后测定土壤微生物生物量。

被试物用有机溶剂溶解后添加的，还应设置添加相同量有机溶剂但不添加被试物的溶剂对照组，用于试验开始、试验期间和试验结束后测定土壤微生物生物量。

10 采样与检测

在合适的时间间隔取两个培养瓶，用不同极性的有机溶剂提取检测土壤中的被试物和代谢物。除 0 d 外，还应至少测定 5 次。应根据被试物的降解和代谢物的生成和降解情况确定采样时间间隔，例如 0 d、1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、30 d、60 d、90 d 等。

应定期测定每个培养装置的吸收液或吸附剂中的挥发性产物，测定频率如下：

- 试验开始后的第 1 个月，每 7 d 测定 1 次；
- 试验开始后第 2 个月至试验结束前，每 14 d 测定 1 次；
- 试验结束时测定。

当使用 ^{14}C 标记时，每次采样均应氧化燃烧后测定未被提出的放射性以计算质量平衡回收率。

厌氧培养条件、水稻土培养条件和水稻土厌氧培养条件，可将土壤和水相合并测定，也可过滤或离心后再分别提取测定。

当未萃取残留 > 添加放射性的 10% 时，应按附录 B 确定萃取方法的合理性。

11 数据处理

每次采样检测的被试物、代谢物、未萃取残留的量可用添加放射性的比例（%AR）表示也可用 mg/kg_{\pm} 表示，挥发性物质以 %AR 表示。每次采样均应计算质量平衡回收率，以 %AR 表示。

主要代谢物均应定性。

按 NY/T 3150 评估被试物的降解动力学并计算被试物和主要代谢物的 DT_{50} 、 DT_{90} 。

12 质量控制

12.1 分析方法的回收率

被试物加入土壤后应立即提取检测至少两个土壤样品，以验证分析方法的重现性和被试物添加的一致性。使用同位素标记的被试物时，平衡回收率应为 90%~110%；使用非标记被试物时，回收率应为 70%~110%。

12.2 分析方法的重现性和灵敏度

使被试物在土壤中充分培养生成代谢物，通过重复测定土壤提取物的方式验证被试物和代谢物定量分析方法的重现性。

被试物及其代谢物分析方法的检出限（LOD）至少应为 0.01mg/kg_{干土}，或初始添加量的 1%。

13 试验报告

试验报告至少应包括以下内容：

a) 被试物：

——通用名、化学名、化学文摘登录号（CAS 号）、结构式（对于放射性标记的被试物，应指出标记位置）及相关的理化性质；

——纯度；

——放射化学纯度和比活度。

b) 对照物：

——用于对代谢产物进行表征或鉴别的对照物的化学名和结构式。

c) 试验用土壤：

——确切的采集地点；

——采集时间和采集方法；

——土壤性质，如 pH 值、有机碳含量、质地、阳离子交换量、容重、持水能力和微生物生物量，模板参见附录 C 的表 C.1；

——储存时间和储存条件。

d) 试验条件：

——试验时间；

——被试物添加量；

——所用溶剂及添加被试物的方法；

——土壤的初始质量及每次采样检测的质量；

——培养装置；

——空气流速（对于气体流动式培养装置）；

——试验温度；

——土壤含水率；

——试验开始、试验期间、试验结束时的微生物生物量（对于好氧培养条件）；

——试验开始、试验期间、试验结束时的 pH 值、溶解氧、氧化还原电位（对于厌氧培养条件、水稻土培养条件和水稻土厌氧培养条件）；

- 提取方法；
- 土壤和吸收剂中被试物及其代谢物的定性定量方法；
- 处理组和对照组的数量；

e) 试验结果：

- 分析方法的重现性及灵敏度；
- 分析方法的回收率；
- 分别以%AR 和 $\text{mg/kg}_{\text{干土}}$ 表示的试验结果的表格，以%AR 表示的试验结果模板参见附录 C 的表 C.2；

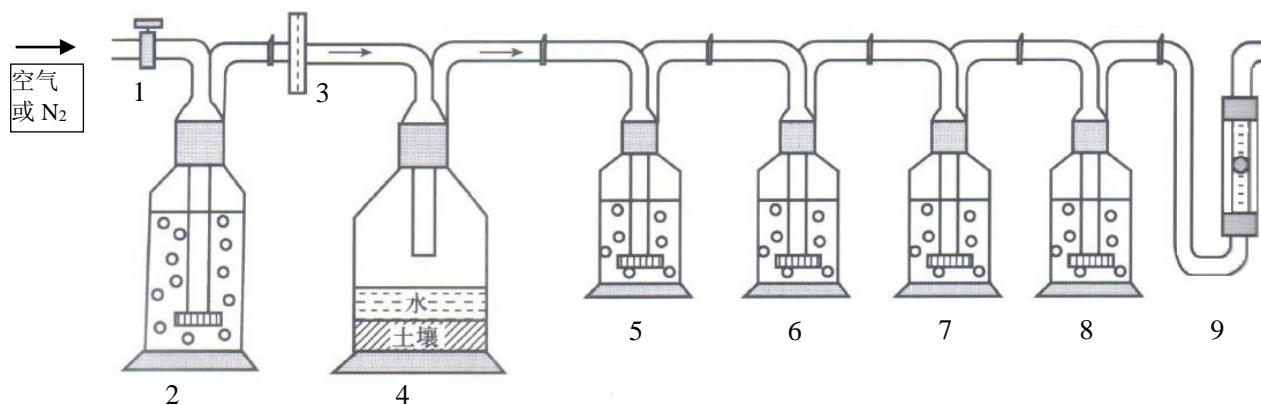
录 C 的表 C.2；

- 质量平衡回收率，模板参见附录 C 的表 C.3；
- 土壤中未萃取残留的表征；
- CO_2 及其他挥发性化合物的量；
- 土壤中被试物及其代谢物的浓度-时间图；
- 被试物的降解动力学、被试物及其代谢物的 DT_{50} 、 DT_{90} ；
- 代谢途径；
- 原始数据（色谱图、降解动力学评估报告、代谢物的定性方法）。

附录 A
(资料性附录)

培养装置

A.1 气体流动式培养装置 (见图 A.1)



1——针型阀;

2——水;

3——0.2 μm 滤膜 (仅在无菌培养条件下使用);

4——土壤培养瓶 (仅在厌氧或水稻土或水稻土厌氧条件下保持土壤表面有水层);

5——乙二醇用于收集挥发性有机物;

6——硫酸用于收集碱性挥发物;

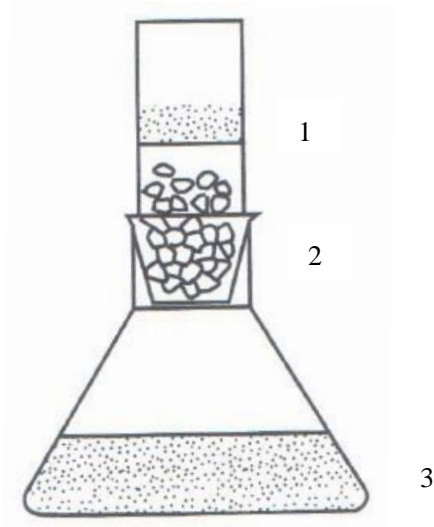
7——氢氧化钠用于收集 CO_2 及其他酸性挥发物;

8——氢氧化钠用于收集 CO_2 及其他酸性挥发物;

9——流量计。

图 A.1 气体流动培养装置示意图

A.2 二氧化碳测定仪式培养装置 (见图 A.2)



1——碱石灰用于吸收二氧化碳；

2——油处理过的玻璃棉或聚氨酯泡沫用于吸收挥发性有机物；

3——土壤及被试物。

图 A.2 二氧化碳测定培养装置

附录 B
(规范性附录)

萃取方法的合理性判定

B.1 萃取方法的合理性判定

萃取离子化合物时，萃取剂体系中应包括极性溶剂；萃取中性有机化合物时，萃取剂体系中应包括非极性溶剂；混用多种溶剂，包括弱酸或弱碱，可提高萃取效率。试验期间每种土壤均应尝试用多种极性和非极性溶剂萃取，不应以萃取剂中添加碳酸铵、强酸或强碱以及使用高温、高压、剧烈震荡、超声等萃取条件或索氏提取代替。可在多种不同极性溶剂的同时使用超声萃取或索氏提取的方法。萃取不应改变被试物及其代谢物的化学结构，例如对酸性条件下易水解的被试物不应使用酸性溶剂萃取。

当未萃取残留 $>10\%AR$ 时，萃取剂体系中应包括对母体溶解性最好的溶剂（根据在有机溶剂中的溶解性试验确定），除非有其他合理的理由，应从以下 3 个介电常数范围内至少各选择一种溶剂：

——介电常数为 18~80 的极性溶剂，如水、甲酸、甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙腈、二甲基亚砷等；

——介电常数为 6.0~9.1 的极性溶剂，如乙酸、乙酸乙酯、四氢呋喃、二氯甲烷等；

——介电常数为 1.9~4.8 的非极性溶剂，如正己烷、苯、甲苯、1,4-二氧六环，三氯甲烷、乙醚等。

选择萃取剂时还应注意介电常数以外的其他因素，例如在溶剂中较难溶解的化合物可通过形成乳状液的方式萃取。当被试物在酸性或碱性条件下性质有差异时，应调节萃取剂的 pH 值使回收率最大。

可在试验的后期使用额外的萃取剂体系，但样品应同时用前期使用的萃取剂体系萃取。如结果表明新萃取剂体系的萃取效率显著高于原萃取剂体系，应重新开展试验并在整个试验周期内同时使用两种萃取剂体系。

在 0 d 时回收率较低或重复性较差或试验期间未萃取残留出现减少的趋势，可判定萃取方法不合理。

未萃取残留												
CO ₂												
挥发性有机物												
质量平衡回收率												

C.3 质量平衡回收率

试验报告中可按表 C.3 提供质量平衡回收率的数据。

表 C.3 [被试物]在[土壤类型]中的质量平衡回收率，以%AR 表示

采样间隔 (d)		0											
重复		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
挥发物	CO ₂												
	挥发性有机物												
	合计												
土壤中已萃取残留	第一次萃取												
	第二次萃取												
	第三次萃取												
	第四次萃取												
	总已萃取残留												
未萃取残留													
质量平衡回收率													

参考文献

- [1] OECD (2002). Guideline for The Testing of Chemicals No.307 Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil.
 - [2] US EPA (2012) . Guidance for Reviewing Environmental Fate Studies.
 - [3] US EPA (2014) .Guidance for Addressing Unextracted Pesticide Residues in Laboratory Studies.
-