

前 言

船舶散装液体危害性评价规范系根据 MARPOL 73/78 附则 II 的要求,为船舶散装运输的液体化学品的污染分类而进行的污染危害性评价和污染分类的方法,其危害评价和分类的原则和内容系根据附则 II 中有害液体物质分类准则(附则 II 之附录 1)以及海洋污染科学专家组关于船运有害物质危害性评价的原则确定。评价内容包括:1. 水生生物积累试验;2. 水生生物沾染试验;3. 水生生物急性毒性试验;4. 哺乳动物毒性试验(即本标准);5. 休息环境舒适性影响;6. 分类程序和方法。鉴于导则中危害性 C(经口急性毒性)及 D(皮肤接触和吸入毒性)均为哺乳动物试验内容,故合为一个分标准;另外,环境舒适性的评价系根据物质对人的毒性、刺激性以及由其理化特性决定的对环境影响的持久性等综合评价,无具体试验方法,所以不单列分标准,而并入评价程序和分类中。

本标准由中华人民共和国交通部提出。

本标准起草单位:交通部水运科学研究所负责起草。

本标准起草人:王洁云、张秀芝、张宝东、赵前。

中华人民共和国国家标准

船舶散装运输液体化学品危害性评价规范

哺乳动物毒性试验方法

GB/T 16310.4—1996

Specification on evaluation methods of hazards of liquid
chemicals transported in bulk by shipping
—Toxicity test method for mammal

1 范围

本标准规定了哺乳动物急性毒性和毒理学试验方法。

本标准适用于船舶散装运输液体化学品(以下均称化学品)的危害性评价和污染分类。

2 引用标准

下列标准所包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

GB 7919—87 化妆品安全性评价程序和方法

卫监发(91)第17号 农药安全性毒理学评价程序

MARPOL 73/78 控制散装有毒液体物质污染规则

定义

本标准采用下列定义。

液体化学品 liquid chemicals

系指那些在温度为 37.8℃时蒸汽压力不超过 2.8 kPa/cm² 的物质。

4 试验方法

4.1 急性经口毒性试验

4.1.1 目的

4.1.1.1 求出试验化学品对试验动物的半致死剂量(LD₅₀),初步估计该化学品对人类的危害,为毒性分级和制定安全防护措施提供依据。

4.1.1.2 通过观察急性毒效应的症状,初步了解动物中毒表现和毒作用的靶器官。为亚慢性与慢性试验提供剂量水平设计的依据。

4.1.2 试样

化学品原液。

4.1.3 试验动物

4.1.3.1 选用品系遗传背景明确的初成年大鼠和小鼠。大鼠体重 180~220 g,小鼠体重 18~22 g,同一次试验中,同性别动物体重波动范围小于 10%。

国家技术监督局 1996-05-16 批准

1996-12-01 实施

4.1.3.2 每一剂量组,大鼠不少于10只(雌雄各半),小鼠雌雄各10只为宜。试验前动物应检疫,观察3~5天,确认健康,方可使用。

4.1.4 剂量分组

4.1.4.1 至少设4~5个剂量组,各剂量组之间要有适当的间距,以便各组出现不同程度的毒性反应或死亡率,求得剂量反应曲线及 LD_{50} 。如染毒剂量达5 000 mg/kg以上,动物仍不出现死亡,则不需要进行更高剂量组的试验。

4.1.5 染毒方法及观察时间

4.1.5.1 染毒前隔夜禁食,不禁水,通过胃管一次性或在24 h内多次投毒,投毒后继续禁食2 h。

4.1.5.2 投毒后观察并记录动物的中毒表现,出现症状和死亡时间。一般观察期为14天。

4.1.6 观察指标

4.1.6.1 仔细观察中毒表现的发生发展过程和规律,观察内容包括:体位异常、痉挛、抽搐、麻痹、运动失调、对外反应过敏或迟钝;瞳孔散大或缩小、流涎或流泪;紫绀、背毛蓬松、眼球突出等。

4.1.6.2 投毒前,死亡时各测一次体重。

4.1.6.3 对染毒期间死亡的动物,进行肉眼尸检,若有可见病变时,进行镜检,以获取有用的资料。

4.1.7 数据处理

用任何一种公认的统计方法计算 LD_{50} 。

4.2 急性经皮毒性试验

4.2.1 目的

了解化学品对皮肤直接接触能否引起局部皮肤损伤,全身中毒,致死剂量,中毒特征等毒性反应,为毒性分级和制定防护措施提供依据。

4.2.2 试样:化学品原液或制剂。

4.2.3 试验动物

4.2.3.1 大鼠、兔、豚鼠任选一种。

4.2.3.2 为有足够的涂敷面积,选成年动物。大鼠体重200~300 g,兔2~3 kg,豚鼠350~450 g。

4.2.4 剂量分组

4.2.4.1 设4~5个剂量组,各剂量组间应有一定的间距,以便染毒组能出现毒性表现和死亡。

4.2.4.2 如果染毒剂量大于1 000 mg/kg仍不出现死亡,则不需要进行更高的剂量试验。

4.2.5 染毒方法

4.2.5.1 染毒前24 h将动物腹部或背部剃毛,注意勿损伤皮肤,剃毛面积应占体表面积的10%。

4.2.5.2 染毒部位应在大鼠背部中央或腹部,兔通常在背部中线两侧。

4.2.5.3 先将动物固定,在略小于剃毛区面积内进行定量敷毒,然后覆盖一个与剃毛面积相当的盒式罩,再用胶布固定。

4.2.5.4 根据需要,染毒时间可为4 h,6 h。为防止动物舔食受试化学品,可使用限制动物活动的制动装置。

4.2.5.5 染毒后取下罩盒,擦去皮肤上的受试物,用清水清洗,但要特别小心,避免损伤皮肤或毒物扩散到皮毛中。观察中毒表现。

4.2.6 观察指标

观察并记录中毒表现、死亡时间及死亡率。

4.2.7 数据处理

用任何一种公认的统计方法计算 LD_{50} 。

4.3 急性吸入毒性试验

4.3.1 目的

4.3.1.1 测试可能经呼吸道进入机体的化学品对呼吸道及全身的损伤及其危害程度。

4.3.1.2 求出吸入接触的致死浓度,为化学品毒性分级和制定安全防护措施提供依据。

4.3.2 试样

化学品原液。

4.3.3 试验动物

4.3.3.1 一种以上哺乳动物,首选大鼠。

4.3.3.2 动物性别,体重,每组数量同 4.1.3。

4.3.4 剂量分组

设计应有毒性反应直至死亡的几个间距染毒组,一般为 4~5 组。以便各组产生不同程度的中毒反应或死亡率,求出半致死浓度(LD_{50})。如果浓度超过 10 mg/L 染毒 2 h 仍无死亡,则无需再做高浓度试验。

4.3.5 染毒方法及观察时间

4.3.5.1 染毒方式为鼻、头部接触或全身置于染毒柜内接触(染毒柜大小以染毒部位总体积不超过染毒柜的 5%为宜)。

4.3.5.2 染毒方式分为静式和动式。

4.3.5.3 染毒时间为 2 h。

4.3.5.4 染毒后观察并记录动物的中毒表现及死亡时间,观察周期一般为 14 天。

4.3.6 试验项目同 4.1.6。

4.3.7 数据处理

用任何一种公认的方法计算 LC_{50} 。

4.4 急性皮肤刺激试验

4.4.1 目的

测定化学品对哺乳动物皮肤是否有刺激或腐蚀作用,估计人体接触该化学物质时可能出现的危害。

4.4.2 试样

化学品原液。

4.4.3 试验动物

4.4.3.1 多种哺乳动物,首选白色家兔。

4.4.3.2 每个染毒组至少 3 只健康家兔。

4.4.4 剂量分组

4.4.4.1 受试化学品 0.5 mL 或 0.5 g 为一次药量。

4.4.4.2 动物自身皮肤作为对照。

4.4.4.3 如果受试化学品 $pH \leq 2$ 或 $pH \geq 11$,则不必进行皮肤刺激试验。

4.4.5 试验步骤

4.4.5.1 试验前 24 h 将背部毛剪掉,面积为 6 cm²。

4.4.5.2 涂上受试化学品,再用纱布盖上,以胶布固定或采用其他封闭性盖罩。

4.4.5.3 涂敷时间一般为 4 h。试验结束时,用水洗去残留的化学品,但注意不要损伤皮肤。

4.4.5.4 去掉受试液体化学品后 30 min、60 min、24 h、48 h、72 h 检查动物局部皮肤有无红斑或水肿,并按表 1 划分反应的等级。

表1 皮肤反应分级

红斑和焦痂	
0级	无红斑
1级	很轻的红斑(勉强看到)
2级	明显红斑
3级	中等红斑
4级	严重红斑(紫红)到轻度焦痂形成(深部损伤)
水 肿	
0级	无水肿
1级	很轻的水肿(勉强看到)
2级	轻度水肿(隆起而轮廓清楚)
3级	中度水肿(隆起近1 mm)
4级	严重水肿(隆起超过1 mm,并超出敷药面积)

4.4.5.5 根据需要做进一步的观察,以确定反应的可逆性。一般观察期不超过14天。

4.4.6 把动物试验结果外推到人,要慎重考虑,在很多情况下,人对刺激物质比动物要敏感些。

4.5 急性眼粘膜刺激试验

4.5.1 目的

测定化学品对哺乳动物眼粘膜是否有刺激,初步估计对人体健康的影响。

4.5.2 试样

化学品原液。

4.5.3 试验动物

幼龄成熟白色家兔,至少6只。试验前24 h检查受试家兔双眼,有异常者不得使用。

4.5.4 剂量

4.5.4.1 受试液体化学品一般为0.1 mL,固体、糊状或颗粒状受试物不超过100 mg或0.1 mL。

4.5.4.2 对具有强酸、强碱性质的化学品,如 $\text{pH} \leq 2$ 或 $\text{pH} \geq 11$,不需做此试验。

4.5.5 染毒方法及观察时间

4.5.5.1 将一侧下眼睑轻轻拉下,把受试化学品滴入结膜囊内,为防止该化学品外溢,立即轻轻闭合眼睑约1 min。如用喷雾染毒法,将眼睑分开,在眼前方10 cm距离处迅速喷雾1 s。

4.5.5.2 给药后24 h内不洗眼。

4.5.5.3 另一侧眼为对照,不另设对照组。

4.5.5.4 给药后1 h、24 h、48 h、72 h分别检查眼睛。如72 h仍无刺激反应,终止试验。

4.5.5.5 如果出现角膜损伤或眼睛其他部位出现反应,需继续观察损伤的经过及其可逆性,观察期最长不超过21天。

4.5.5.6 染毒后72 h刺激反应仍不消退时,至少另选6只家兔观察洗眼效果。即滴入受试化学品后,分别在4 s、30 s进行5 min洗眼,观察洗眼后的眼睛反应情况。

4.5.6 观察指标

除了观察角膜、虹膜外,还应注意其他部位的损害。按表2眼睛损害分级详细记录。

表 2 眼睛损害分级

角 膜	
0 级	无溃疡或混浊。
1 级	散在或弥漫性混浊。
2 级	半透明区容易分辨,虹膜模糊不清。
3 级	出现灰白色半透明区,看不到虹膜细节,瞳孔大小勉强看清。
4 级	角膜不透明或穿孔。
虹 膜	
0 级	正常。
1 级	瞳孔对光反应迟钝。
2 级	瞳孔对光无反应、虹膜出血、有肉眼可见的破坏。
结 膜	
0 级	血管正常。
1 级	睑结膜、球结膜、角膜和虹膜充血。
2 级	散在的深红色,各个血管不易分辨。
3 级	散在的紫红色。
结膜水肿	
0 级	无水肿
1 级	轻度水肿。
2 级	明显水肿,并有部分眼睑外翻。
3 级	水肿使眼睑接近半闭合。
4 级	水肿使眼睑超过半闭合。

5.7 眼睛的刺激等级须与刺激的性质、可逆程度或观察到的其他反应联系起来进行评价。

6 皮肤致敏试验

6.1 目的

测定受试化学品诱发皮肤致敏反应的可能性,推测对反复接触该化学品的人群可能存在的危险。

6.2 试样

化学品原液。

6.3 试验动物

豚鼠,所用动物的数量和性别取决于该化学品的使用方法。

6.4 剂量

6.4.1 致敏诱导剂量允许引起皮肤轻度刺激反应,激发剂量低于致敏剂量,不引起原发性皮肤反应,以预备试验结果确定。

6.4.2 采用动物自身对照。

6.5 试验方法

6.5.1 在豚鼠背部正中两侧各去毛 4 cm²,一块涂药,另一块作为对照。2 h(或 4 h)后用清水(或酒)轻轻拭去,对照区也同样擦拭,进行对比观察。

6.5.2 每日观察局部反应,连续 12 日,并做详细记录。

6.5.3 第 12 日起,相继重复 4.6.5.1,4.6.5.2 一或二次,如不出现过敏反应,则认为该化学品不引

起过敏反应。

4.6.6 试验项目

与 4.4.5.4 基本相同。如皮温、皮色、水肿、红斑、干燥、溃疡或结痂,以及恢复情况等。

4.7 迟发性神经毒性试验

4.7.1 目的

迟发性神经毒性是指能引起迟发性的迁延性运动共济失调。通过本试验,可估计和评价受试化学品的迟发性神经毒性。有机磷酸酯类化合物和某些具有有机磷酸酯剂结构特点的化合物应进行本试验。

4.7.2 试样

化学品原液。

4.7.3 试验动物(选用常规试验动物)

4.7.3.1 选用健康、步态正常的来亨母鸡,鸡龄 8~14 个月,体重 1.5~2 kg。

4.7.3.2 每剂量组母鸡数量应保证试验结束时至少存活 6 只,到期处死。如需观察恢复情况,则应在开始实验时增加延长观察期的动物数。

4.7.4 染毒方法

4.7.4.1 一般设三个染毒剂量组,一个阳性对照组和一个空白对照组。

a) 高剂量组:根据 LD_{50} 或预试验确定,一般受试物的剂量应接近致死剂量。

b) 低剂量组:一般为高剂量的 1/5~1/10。

c) 中剂量组:剂量在高低之间。

d) 阳性对照组:500 mg/kg TOCP(三邻甲苯磷酸酯)。

e) 空白对照:除不接触受试化学品外,其他各种条件与试验组相同。

4.7.4.2 一般采用隔夜禁食,经口给药,给药前 10 min 内,所有受试母鸡均予肌肉注射 10 mg/kg 硫酸阿托品。

4.7.5 试验期限

观察期一般为 21 天。如未见异常反应或有可疑反应时,须再次染毒,继续观察 21 天。每天观察母鸡有无行为异常,运动性共济失调和瘫痪等发生。到期处死母鸡作病理组织学检查。

4.7.6 临床观察和检查

4.7.6.1 投毒后每天观察记录染毒鸡的外观体征,行为活动,特别是鸡的站立和运动姿势以及运动失调程度。必要时可强迫母鸡活动,如爬楼梯等,以便观察迟发性神经毒性的最小反应。其典型症状分级标准如表 3,一般迟缓性神经毒性在第 7~第 10 天开始出现并逐渐加重。

表 3 迟缓性神经毒性分级标准

I	步态稍异常	III	勉强站立
II	步态严重异常	IV	躺倒在地

4.7.6.2 每周称体重一次。

4.7.6.3 对试验期结束后死亡或存活动物作延髓/桥脑、大脑皮质、小脑、脊髓(包括上位颈段、胸位中段、腰骶结合部和坐骨神经等)作组织切片。坐骨神经切片要作髓鞘和轴索的特殊染色(lover 染色)。镜检查,亦可作电镜观察。

4.7.7 结果评价

试验结果要结合所观察的神经毒性反应和神经组织学检查结果进行综合考虑,特别要注意不同受试物剂量下神经毒性反应的有无,发生率和严重程度的关系。

4.8 致突变试验

4.8.1 目的

检测受试化学品的诱变性,是否具有致癌作用的可能性。

4.8.2 原理

致突变是指化学诱变源损伤生物的遗传物质,导致不可逆的损伤。这种诱变如发生在体细胞,则影响个体本身;如发生在生殖细胞,则可遗传到后代。

4.8.3 试样

化学品原液

4.8.4 试验方法

按“农药安全性毒理学评价程序”:

- a) Ames 试验;
- b) 哺乳动物骨髓细胞微核试验;
- c) 大鼠或小鼠骨髓细胞染色体畸变试验;
- d) 生殖细胞染色体畸变试验;
- e) 显性致死试验;
- f) 精子畸变试验。

上述 6 种致突变短测试验方法中,Ames 试验为首选,其次为微核、骨髓细胞、生殖细胞染色体畸变试验。其他试验可作为补充。

4.8.5 评价

致突变试验的任何阳性结果,均表示该受试化学品是一种潜在的致突变物。同时也一定要认识到,目前所用的方法,并不能测出所有具有致突变作用的化学品。因此,所得的阴性结果并不能作为完全无遗传毒性的依据。

4.9 致畸试验

4.9.1 目的

测定受试液体化学品能否在胚胎发育时期引起永久性的结构和机能的改变。

4.9.2 试样

化学品原液。

4.9.3 试验动物

4.9.3.1 大鼠,兔和小鼠。推荐使用大鼠和兔。

4.9.3.2 每个剂量组需要 15~20 只妊娠的大鼠或小鼠,8~12 只妊娠兔,确保有足够数量的仔畜,以便评价受试化学品的致畸作用。

4.9.4 剂量

4.9.4.1 至少选三个按几何级数增加的剂量,最高剂量为能产生约 1% 死亡率的最大容许剂量,最低剂量是胎儿不产生显著毒性反应的剂量。中间剂量有助于评价观察到的剂量—反应关系。为准确估计这三个剂量,有必要在胎儿器官形成期用几种不同的剂量进行一次预试验。

4.9.4.2 如果剂量大于 1 000 mg/kg 时对受试动物仍不产生明显的毒性作用或致畸作用,可不设其他剂量组继续试验。

4.9.5 试验方法

按“农药安全性毒理学评价程序”。

4.9.6 评价

致畸试验结果应根据观察到的反应和引起反应的剂量进行评价。需要考虑该试验所用的动物品种/品系的历史性致畸数据。典型的畸形是显而易见的,如兔唇,泌尿系统发育不全,畸形足等,各种情况都有可能发生,而且某一受试化学品的效应,有时仅仅是增加正常情况下的畸胎发生率。最后的评价有赖于所得结果的统计分析。

4.10 生殖毒性试验

4.10.1 目的

评价受试液体化学品对动物生育能力,妊娠及后代的影响,提供母体和后代繁殖能力和妊娠的资料。受试液体化学品的影响可通过几代繁殖的表现加以确定。

4.10.2 原理

生殖毒性试验分三个阶段。第一阶段为受试化学品对父体、母体生育能力的影响,这些影响可能是性腺功能、青春期、交配行为、受孕率的改变等。第二阶段为胎儿的发育及正常程度,畸变和突变反应,以及死胎的比率。第三阶段为母体的反应,例如哺乳及后代接受情况,这与后代的成长及性功能的成熟有关。

4.10.3 试验方法

按“农药安全性毒理学评价程序”

4.10.4 评价

根据临床所见的行为改变,脏器重量,肿瘤和其他损伤,死产及肉眼和病理组织学检查来评价所得的结果。为保证评价结果的准确,对得到的数据要进行严格的统计分析。

4.11 亚慢性毒性试验

4.11.1 目的

观察反复接受受试化学品可能对机体的毒性作用和靶器官的影响,同时提出无作用剂量,该值可作为慢性毒性试验的剂量,并为确定人的安全剂量提供依据。

4.11.2 试样

化学品原液。

4.11.3 试验动物

4.11.3.1 用断乳后年幼健康的动物,首选大鼠,也可用狗或灵长类动物。

4.11.3.2 每一剂量组大鼠至少 20 只,雌雄各半;狗至少 8 只,雌雄各半。试验结束时的动物数应足以对毒性反应作出有意义的评价。

4.11.4 剂量

至少有三个剂量组和一个对照组。剂量组应包括足以产生毒性反应但不会致命的高剂量组,低剂量组为确定无效应剂量,中剂量组用以确定前二者的正确性。

4.11.5 染毒期限为 90 天。

4.11.6 染毒途径

根据试验目的、要求以及可能与人接触的方式,选择吸入、经皮、灌胃或饲养等染毒方式。

4.11.7 试验项目

4.11.7.1 血液学检查,包括红细胞数,血红蛋白含量,白细胞数及其分类,血小板数等。

4.11.7.2 血液生化检查,包括血清谷丙转氨酶,血清谷草转氨酶,鸟氨酸脱羧酶,尿素氮,白蛋白,血液肌酐,总胆红素和血清总蛋白,高铁血红蛋白和胆碱酯酶等。也可根据受试化学品毒性作用特点,增加或减少指标。

4.11.7.3 尿常规。

4.11.7.4 体重。

4.11.7.5 脏器系数。

4.11.7.6 病理组织学检查:心、脑、脾、肺、肾、肝、肾上腺、甲状腺、睾丸、卵巢等。

4.11.8 评价

评价不同剂量组动物有无异常现象,反应发生率和严重程度之间的关系,靶器官情况等,最好提出无作用剂量或阈剂量。