

## 第二节 环境卫生标准制订的依据、原则和方法

### 一、制订环境卫生标准的依据和原则

现行环境卫生标准的主要内容是环境中有害物质的限量标准(如地面水或生活居住区大气中有害物质最高容许浓度)。因此,关于环境卫生标准制订的依据和原则,也是结合限量标准来阐述的。

限量标准制订的依据就是根据有害物质对机体的最大无作用剂量(或浓度、强度),亦称阈下剂量(或浓度、强度)或阈值,一般来说,环境中有害物质对机体的有害作用是有阈值的,即只有当其浓度或强度超过一定限度时,才会对机体产生有害作用,而且随着有害物质浓度(或强度)的增加,有害作用的严重程度也随之增强。这就是所谓的剂量效应或反应关系。因此,在研制环境卫生标准时,关键是通过研究有害物质对机体作用的剂量反应关系,来确定该有害物质的阈值和最大无作用值。依据此值即可提出最高容许浓度的建议值。

环境中有害物质对人体健康影响往往是多方面的,有直接的,也有间接的,这就需要确定用哪种有害作用的剂量反应关系来确定作为标准依据的阈值或最大无作用值。此外,有害物质作用于机体,使人体从最佳健康状态发展到严重的健康损伤之间,是一个逐步发展过程,表现为一个连续作用谱带,即由未觉察到的反应,经过代偿或耐受阶段,到出现早期可观察到的可疑健康影响,然后发展到无可争辩的健康损害(如明显疾病、劳动能力丧失,甚至死亡)。在这健康损伤过程中,选择哪一阶段作为健康损伤的指标,这是确定对健康直接影响的阈值的关键问题。以早期改变为指标研究出的阈值,就比用晚期改变为指标得出的阈值要低,因此所提出的最高容许浓度值就会较低,即要求更为严格。

不同国家的学者对健康损伤过程中选择哪一阶段代表损害的看法是不同的,美国学者认为代偿功能是机体的一种健康反应,是机体的正常保护功能,属于正常范围,所以一些生理、生化的适应性变化不属于健康损害,以出现明显早期中毒症状的阈浓度为制订标准的依据。前苏联学者则不允许有代偿性改变,认为代偿性反应是潜在病理状态,而以发现任何正常改变,就认为存在对健康的潜在危害。因此,在研究环境卫生标准时,比较偏重于采用行为、条件反射或其它敏感指标。近年来,由于各国的频繁交流,在标准的依据和研究方法上要求统一的趋势,为此世界卫生组织于1963年10月在日内瓦召开的区域性大气质量标准和研究方法讨论会上,提出了大气卫生标准的四级要求,作为各国制订环境卫生标准的参考依据。

第一级:在小于此种浓度和接触时间内,根据现有的知识,不会观察到直接或间接的反应(包括反射性和保护性反应)。

第二级:在大于此种浓度和接触时间内,对人的感觉器官有刺激,对某些植物有损害或对环境产生其他有害作用。

第三级：在大于此种浓度和接触时间时，可使人的生理功能发生障碍和衰退，引起慢性疾病和缩短寿命。

第四级：在大于此种浓度和接触时间时，可使对污染物敏感的人发生急性中毒或死亡。按照上述分级，我国大气和水质卫生标准基本上属于一级，有部分介于一、二级之间。也就是说，我国卫生标准中规定的最高容许浓度，是指在该浓度下根据现有的知识，不会观察到直接或间接的反应，不会发生任何偏离正常生理反应范围的改变。最高容许浓度是相对的，因为随着医学科学技术的发展，一些现在观察不到的反应，也许将来可检出，当然最高容许浓度也将随之修改。

制订环境卫生标准是一项政策性和技术性很强的工作，要求过严会造成不必要的损失，过宽又会造成人民健康的损害。因此，在制订标准时不仅要充分考虑卫生基准资料，还应考虑到社会、经济、技术等方面的条件。目前我国制订卫生标准的总原则是：卫生上安全可靠，技术上可行，经济上合理。其目的是使卫生标准既有充分的科学依据，能够起到保护环境和人民健康的作用，又能适合我国经济技术水平，经过努力能付诸实施，从而使卫生标准工作更好地为促进我国社会主义经济建设，为实现“四个现代化”服务。我国环境卫生标准制订的具体原则是：

#### 1. 不引起急性或慢性中毒及潜在的远期危害(致癌、致畸、致突变作用)

大气、水的卫生标准应保障居民不发生急性或慢性中毒或其它一些非特异性疾患。由于环境中的污染物极其复杂，且有污染物浓度低、作用时间长、影响范围广等特点，故应考虑到受保护的居民包括老、幼、病、弱及居民日夜呼吸和长期饮用等特点。

环境中某些有害物质对人体具有远期危害(致癌、致畸、致突变作用)，现已日益引起科学界的重视，且已在制订卫生标准的过程中开展这方面的研究，以防止对人体健康产生远期的潜在影响，使所制订的标准具有更为积极的预防作用。

#### 2. 对主观感觉无不良影响

大气、水中有害物质的最高容许浓度应低于眼睛、鼻、口腔、上呼吸道粘膜的感觉阈或刺激作用阈，在此种浓度下人们感觉不到明显的异嗅、异味、异色和不良的刺激。

研究证明，不良的气体长期作用和刺激，能反射性地引起人体生理功能，甚至某些病理改变。水的感觉性状不良(如有色、浑浊、异嗅、异味等)，可使人产生厌恶感，影响食欲，抑制胃液分泌等。某些有害气体如二氧化硫相当于嗅觉阈浓度时，对人体长期作用后可引起慢性支气管炎等。

#### 3. 对人体健康无间接影响

在制订环境卫生标准时，我们不但要考虑某些环境因素对人体健康所产生的直接作用，而且要考虑它们可能会恶化生活卫生条件，而对人体健康产生间接影响。

例如大气中灰尘浓度高时会降低大气透明度，增加雾的次数，影响太阳辐射，减少到达地面的紫外线，从而削弱人体抵抗疾病的能力；一些有害气体可危害植物生长，影响绿化及植物对大气的自净作用，污染环境，影响开窗换气，晾晒衣服等。

地面水中有害物质到达一定浓度时，可影响水的自净能力，使卫生条件恶化，影响鱼类生存。因此，从保护环境、维持生态平衡、促进人体健康出发，最高容许浓度应低于上述各种间接影响的阈浓度。

#### 4. 选用最敏感指标

在研究和制订标准时，应从环境中有害物质多方面的有害作用中，选择对人群最敏感的有害作用，作为该物质的有害作用限制指标，并根据其阈值或最大无作用值确定最高容许浓度。地面水中砷的最高容许浓度制订，研究表明，100mg / L 时不改变水的感官性状；10mg / L 时明显抑制消化过程，但 0.1mg / L 对天然水体自净过程无影响；2mg / L 时可引起代谢变化，而 0.1mg / L 时则无任何作用。由此可见，砷对人体健康的直接影响是最敏感的有害作用，是制订地面水中砷的卫生标准的有害作用限制指标，根据其最大无作用浓度，加上一倍安全系数，提出最高容许浓度为 0.05mg / L。

#### 5. 技术可行和经济合理

制订卫生标准时，还要考虑技术的可行性和经济的合理性，即采取技术控制措施（如“三废”排放的控制技术）实现标准的可能性，如果标准订得很严，而目前控制技术还达不到要求时，这样的标准实际上是行不通的。有的技术虽然可以达到，但要大量的投资，这就要结合我国的经济状况，权衡各个方面的利弊加以考虑。此外，还应考虑在贯彻执行标准中，是否有足够灵敏的分析监测方法，可以检出低于标准限制水平而存在于环境中的有害物质。这一点对是否有可能制订标准，以及标准的严格程度起很大限制作用。

## 二、制订环境卫生标准的方法

为了保护居民健康，在制订环境中有害物质的卫生标准时，应根据上述原则，应用不同指标，从多方面进行研究，以探求对人体健康不产生直接或间接危害的容许限量。为此，常采用现场流行病学调查和实验研究（包括对有害物质的稳定性，对环境感观性状和一般卫生状况影响的研究，以及卫生毒理学实验等）的方法。这两种方法是相辅相成的。在实验研究中卫生毒理学实验占有重要地位，毒理实验一般采用小鼠、大鼠、豚鼠、家兔、狗和猴等作为实验对象。这些动物对毒物的反应及作用机理，与人比较相近。但动物与人的种属不同，对有害物质的敏感性及其代谢过程也不一致。因此，利用动物实验资料推算到人有一定的局限性，必须考虑适当的安全系数。但是否符合实际情况，还得通过现场调查，以便进一步验证和修订该物质的卫生标准。流行病学调查方法应用于制订卫生标准，还可为实验研究的设计提供必要的资料。

近年来，为适应环境化学污染物迅速增多的情况，发展了快速估算法与制订综合卫生标准的方法。

### (一) 流行病学调查方法

流行病学调查是研究制订环境卫生标准重要方法之一，它是通过直接调查人群健康效应，来反应环境中有害物质的危害状况的一种方法，所以其调查结果往往比动物实验更有意义。但是，由于环境因素和人群的多变性和复杂性，调查中一些因素有时很难预测和控制，所以流行病学调查不易准确得到剂量-反应方面的结果。

从因果关系和时间先后来说，流行病学调查可分两类：一类是回顾性调查，从果求因，即根据已发生的疾病或危害，查明与环境污染的关系；另一类是前瞻性调查，从因到果，即在一定时期，连续追踪观察污染组与对照组人群各项反应指标，以期得出对居民健康影响的材料。修订某种物质的卫生标准时，可作回顾性调查，制订某种物质的卫生标准时，则可根据动物试验结果，作前瞻性调查。

环境污染流行病学调查的主要内容：

#### 1. 确定调查区

(1) 首先要掌握调查地区的人口学资料、社会经济状况、风俗习惯、工农业生产情况、饮用水及食物的来源及供应情况，医药卫生条件、以及有无可能影响调查结果的疾病情况等。

(2) 切实掌握环境中被检物质的浓度和动态，以及人群摄入前的可能变化。

(3) 环境中除被检物质外，应没有或很少存在其他干扰物质。例如调查硝酸盐的影响时，就要防止亚硝酸盐的干扰。调查砷的影响时，要避免硒的拮抗作用。

(4) 根据环境中有害物质的浓度设置调查区，一般应包括严重污染区，轻度污染区，以及未受污染的对照区。

#### 2. 确定调查对象

(1) 首先要选择敏感人群和高危险人群

敏感人群除指那些具有过敏体质、某些遗传缺陷、营养不良、身体健康状况欠佳外，还与所观察的指标有关，如对苯的敏感性，女性高于男性。又如硝酸盐引起高铁血红蛋白增高，婴儿比幼儿敏感得多。

高危险人群指的是暴露时间长，暴露量大的人群。例如调查松花江甲基汞污染对人群健康影响时，渔民就是高危险人群。

(2) 要求持续暴露三年以上的人群，因接触有害物质一定时间的人群，一般说暴露时间越长，危害越大。

(3)所调查的人群除环境暴露外，无其他额外暴露，如职业接触、服药等。

(4)避免可能影响调查结果的其他因素的干扰，如吸烟、饮酒、特殊疾病、妊娠等。

### 3. 确定调查指标

根据所调查的有害物质毒作用特点，确定主要的调查指标，观察指标可分为主观指标和客观指标两类。主观指标是以被调查者主观感觉为主要内容的指标，这类指标简便，能够反映一定的问题，但不足之处是易受主观因素的影响。客观指标是以反映人体生理、生化、细胞、免疫等方面为内容的指标，它能客观反映机体的状况，而且能定量，是流行病学调查不可缺少的。

在流行病学调查中按能否确切地反映所调查的有害物质对人群健康的影响，可将观察指标分为特异性指标和非特异性指标。所谓特异性指标是指能够比较确切地反映某有害物质影响的指标，例如，调查空气中一氧化碳对人体健康影响时，碳氧血红蛋白就是特异性指标；非特异性指标是指能够反映人群健康状况，但不能确切地反映某有害物质的影响，如儿童的生长发育、平均寿命、免疫水平、发病率、患病率、死亡率等。

为了判明环境中某有害物质不同浓度对人群健康的影响状况，需要对资料进行统计分析处理。可将调查资料分成两组：一组受一定浓度该有害物质的影响，另一组不受该物质的影响，然后进行比较。流行病学调查研究的统计分析模型可见表 8-1。

在进行回顾性调查时，当两组人群其它条件如年龄、性别、生活条件、工作情况等基本相似，比较  $a/a+c$  与  $b/b+d$ ，经统计处理，如前者显著大于后者，表示该物质的浓度与某种疾病或反应有联系。在作前瞻性调查时，在一定时期内比较受与未受某物质影响的人群，即比较  $a/a+b$  与  $c/c+d$ ，如前者显著大于后者时，说明该污染物浓度与某种反应有关。然后，以与对照组无明显差异的有害物质浓度，作为制订或修订卫生标准的依据。

	有无某种疾病或反应(例数)		
	有	无	合计
受一定浓度某种有害物质影响的人群	a	b	a+b
未受该物质影响的人群	c	d	c+d
合计	a+c	b+d	a+b+c+d

例如饮水中氟化物的卫生标准，就是通过现场流行病学调查，根据饮水含氟量与斑釉发病率的关系而确定不得超过 1.0mg / L( 适宜浓度为 0.5~1.0mg / L)。

## (二)有害物质在环境中稳定性的研究

有害物质的稳定性是指该物质在环境中消失的速度和蓄积性的大小。稳定性强的有害物质污染环境后影响时间长，污染范围广，易于造成严重的危害。如农药 DDT 在土壤中分解 50%约需 3 年；汞、镉等重金属污染地面水和土壤后，可在水体底质和土壤中长期蓄积，并可在鱼类或作物中富集而危害健康，故在制订此类有害物质卫生标准时，应将安全系数适当加大。研究有害物质的稳定性，是为了研究该物质卫生标准时确定现场样品的采集、保存、运输和检验方法，配制该物质溶液及使用期限以及动物实验染毒方式等。不稳定的物质，如易挥发或分解等，应即时采集现场样品，密封保存、运输，并即时进行检测。在各项实验中应新鲜配制该物质的溶液，在动物经口染毒时应用灌胃法，而不用饲入法。

稳定性的研究，通常将蒸馏水配制数种有害物质浓度的水溶液，分别置于大小相同的玻璃容器内，在一定温度下放置不同时间后测定各溶液的浓度，计算该物质在水中消失的速度。

## (三)有害物质对大气和地面水感官性状影响的研究

某些有害物质污染环境后，可使大气和水的感官性状恶化，从而对人体产生不良影响。为此，应确定环境中有害物质对眼睛、口腔、上呼吸道粘膜的刺激作用阈，嗅、味及呈色阈浓度，以便为制订最高容许浓度，提供对感官影响的依据。

大气中某些有害物质能在短时间内对眼睛和上呼吸道粘膜产生刺激作用(如流泪、咳嗽等)和产生异常气味，因此制订一次最高容许浓度时必须测定嗅觉阈或刺激作用阈。其方法应在确保受试者安全的条件下，在实验室内，用特殊装置，直接对健康、嗅觉功能正常的人进行测定，并以大多数受试者的阈值作为依据。

有害物质在水体中嗅觉和味觉阈的测定应在无嗅室内进行，受试者记录试样嗅、味强度级，共分 6 级:0 级—— 无臭、无味；1 级—— 化验员或经训练后的人能察觉的浓度； 2 级—— 一般人注意时能察觉的浓度；3 级——易于察觉；4 级——发生不愉快感觉； 5 级—— 强烈异臭和异味。

测定每天进行一次，重复多次后，经统计处理，分别计算出一级和二级臭和味的平均浓度，并取其 95%可信限下限值作为嗅、味阈浓度。

水的呈色阈浓度的测定是将有色物质，配成水溶液，按倍数稀释法依次递减配成系列溶液，分别装于 50ml 比色管内，加至 10cm 高度，自管口向下垂直观察颜色，以蒸馏水为对照，以不呈色的浓度为无异色的阈浓度。

## (四)有害物质对地面水自净过程影响的研究

正常情况下地面水通过物理、化学、微生物的作用，可使污染物分解、转化为其他物质，从而消除污染，达到自净的目的。当污染严重时，有害物质可对微生物的生长和繁殖产生抑制作用，从而阻碍自净过程的进行。因此，进行有害物质对地面水自净过程影响的研究，就是为了提出影响生态平衡的阈浓度，以达到保护环境的目的。

研究有害物质对地面水自净过程影响的方法，可以用生化需氧量的变化，或观察氨化或硝化过程的影响来测定。

### 1. 生化需氧量试验

将自来水充分曝气脱氯后，静置一夜，加入适量生活污水，混匀后用磷酸盐缓冲液将 pH 调至 7.0~7.4。用此水配制各浓度的有害物质溶液。每一浓度溶液分装至六个溶解氧瓶中，并设对照组。立即测定每一浓度中一瓶的水中溶解氧，其余放入 20℃ 恒温箱内，并分别于 1、2、3、4、5 日各取出一瓶测水中溶解氧，计算生化需氧量，如此重复实验数次，以抑制生化需氧量 15~20% 的有害物质浓度作为阈浓度。例如含磷农药 M-81 (1.0、5.0、10.0 mg / L) 对地面水自净过程影响试验结果见图 7-2。从图中可知，当含磷农药 M-81 浓度为 1.0 mg / L 时，对水的生化需氧量略有增高；5.0 mg / L 时稍有抑制 (5 日约 5%)，10 mg / L 时，抑制比较明显 (三日约 15%，五日约 10%)，故以 10 mg / L，作为其影响地面水自净过程的阈浓度。

有机性有害物质，由于本身在水中易被分解也可消耗水中的溶解氧，因而使水的生化需氧量明显增加，对该类物质则应从保证地面水中溶解氧和生化需氧量的卫生要求出发来限制其排放。在研究中，只能提供增加生化需氧量的资料，而不直接规定其限制浓度。某些有机性有害物质，在低浓度时由于自身分解而使水的生化需氧量增加，高浓度时则表现出对水的生化需氧量的抑制，并且往往前期生化需氧量被抑制，而后期抑制作用消失。如乙醛、巴豆醛等。确定这类物质的阈浓度，应视其消耗水中溶解氧值和产生抑制作用的浓度大小而定。

### 2. 硝化过程影响试验

用含有适量生活污水的脱氯自来水配制不同浓度的有害物质溶液，并留一份作空白对照，分别置于大小相同的玻璃缸内，在室温下放置，每天测定

水的“三氮” (氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮) 含量。共测定 10~15 天。根据测定结果分析“三氮”变化规律，找出影响硝化过程正常进行的阈浓度。

比较影响地面水自净过程各项试验的阈浓度，取其最低者作为防止地面水自净过程受影响的限制浓度。

## (五) 卫生毒理学实验研究

卫生毒理学实验研究主要是通过动物实验,来研究环境中有害物质在实验动物体内的转归、毒效应、毒作用机理,以及剂量 反应特征,从而探索该毒物对实验动物的有害阈剂量和最大无作用剂量(阈下剂量),为制订该物质的环境卫生标准提供依据。

卫生毒理学实验一般包括急性毒性、亚急性毒性(包括蓄积性和耐受性)、亚慢性和慢性毒性试验。上述试验的主要区别在于染毒时间、染毒剂量不同,而且由于实验目的不同在选择和运用观察指标的广度和深度方面存在着差异。从环境毒理学角度看,慢性毒性试验占有重要地位,它对评价环境中有害物质对机体作用的慢性危害及制订该有害物质卫生标准等方面均具有重要意义。但是急性、亚急性和亚慢性毒性试验又是慢性毒性试验必要的基础,它们对慢性试验的设计和进行可提供重要资料。对疑有特殊毒性的有害物质还需进行致突变、致癌和致畸试验,以观察其远期危害作用。

通过卫生毒理学试验,可求出各项毒性指标的阈浓度,为制订卫生标准提供毒作用方面的依据,有害物质的最高容许浓度与其它毒性指标的关系如图 8-3 所示。

在进行动物毒性试验前需收集受试物的化学结构和理化特性等方面的资料,如结构式、分子式、分子量、比重、沸点、熔点、溶解度以及在环境中的稳定性等。因为这些因素对其毒作用有着不同程度的影响。此外,了解受试物在环境中的实测浓度和接触方式,对实验设计也有一定意义。

由于在动物实验中能严格控制染毒剂量(浓度)、途径和持续时间,避免其他混杂物质的干扰,以及能保持环境条件的相对稳定。因而能较正确地观察到相同时间内,不同剂量的有害物质与机体反应之间的关系,即剂量 反应关系。同时通过各种生理、生化指标的测定,毒物在动物体内的代谢转归及病理学检查,有利于阐明受试物的毒作用特点和机理。此外,通过对受试物的特殊毒作用试验,可以预测其对人体的远期危害作用。这些都是临床、流行病学调查所不易发现和确定的。

但另一方面,动物试验也有一定的局限性,例如由于实验动物种属、品系、年龄等不同而带来对受试物敏感性的差异,人与动物寿命及生物学反应性的差异,以及不能获得对有害物质感觉反应(色、嗅、味等)方面的资料。因此在设计动物实验时,应尽可能选择受试物在体内的毒性反应和代谢特点和人体近似的动物。最常用哺乳动物,最好能包括啮齿类和非啮齿类动物。即使如此,在应用动物实验结果外推到人时,仍应十分慎重,在可能条件下应结合人群流行病学调查资料进行综合分析,以便对其毒性作出全面的评价。

### 1. 急性毒性试验(acute toxicity test)

是研究毒物大剂量一次染毒或 24 小时内多次染毒动物后所引起的毒作用试验。其目的是在短期内了解该物质的毒性大小和特点,并为进一步开展其他毒性试验提供设计依据。急性毒性试验可分为急性致死毒性试验和急性非致死毒性试验。

## (1) 急性致死毒性试验

用于评价急性毒性的常用指标是死亡，因其是各种毒物引起最严重的共同结果，易于观察和比较。划分毒性大小的依据是致死剂量(lethal dose, LD)或致死浓度(lethal concentration, LC)。可按照引起动物不同死亡率所需的剂量来表示，如绝对致死量(LD<sub>100</sub>)、半数致死量(LD<sub>50</sub>)、最小致死量(MLD)等，其中最常用来表示急性毒性大小的是LD<sub>50</sub>。因为它与其它致死量相比，对

受试物的个体感受性影响较小，有良好的重现性，结果较稳定；从剂量-反应曲线上看(图 8-4)，它处于曲线的中段，是死亡率对剂量敏感的部位，有 60%~70%死亡动物集中在LD<sub>50</sub>附近，因此它具有很好的代表性。但两种化学物的LD<sub>50</sub>相同；斜率不同时，则斜率小的A物质在较低剂量时较斜率大的B物质危险性大。如当剂量为 1 / 2LD<sub>50</sub>时，A可使动物死亡 20%，而B物质仅使动物死亡不足 1%。

由于LD<sub>50</sub>能较正确地反映受试物毒性的大小，目前均以此作为急性毒性的分级指标。目前急性毒性分级标准较多，现将常用几个分级标准介绍如下：

### 毒性分级

小鼠一次经口LD<sub>50</sub>(mg / kg)

家兔一次皮肤涂敷LD<sub>50</sub>(mg / kg)

小鼠一次吸入 2 小时LC<sub>50</sub>(ppm)

### 剧 毒

<10

<50

<10

高 毒

10~100

50~500

10~50

中 毒

100~1,000

500~5,000

50~500

低 毒

1000~10,000

5,000~50,000

500~5,000

微 毒

>10,000

>50,000

>5,000

毒性分级	大鼠经口 LD <sub>50</sub> (mg / kg)	大鼠吸入 1 小 时LC <sub>50</sub> (mg / m3)	大鼠经皮 4 小 时LD <sub>50</sub> (mg / kg)	鱼毒(鲤 鱼)48 小时 TLm*
高 毒	<50	<2	<200	<1
中 毒	50~500	2~10	200~1,000	1~10
低 毒	>500	>10	>1,000	>10

毒性分级	大鼠经口LD <sub>50</sub> (mg / kg)	兔涂皮LD <sub>50</sub> (mg / kg)	实验动物的种类、染毒方式对LD <sub>50</sub> (或LC <sub>50</sub> )值的影响
极 毒	<1	<5	
剧 毒	1~50	5~44	
中 等 毒	50~500	44~350	
低 毒	500~5,000	350~5,180	
实际无毒	>5,000	>5,180	

很大，因而LD<sub>50</sub>(LC<sub>50</sub>)表示毒性大小时需加注明，如DDT LD<sub>50</sub>250mg / kg(大鼠、经口)。二硫化碳LC<sub>50</sub> 28.38mg / m<sup>3</sup>(小鼠吸入 2 小时)。

### 1) 动物选择

首先选择受试物在体内代谢情况与人体内相近的或对受试物最敏感

### 2) 染毒途径与方式

一般应与人的接触途径相同，常用的有以下几种：

#### a. 经口染毒

常用灌胃法，也可将受试物放在饮水中由动物自由摄取。将受试物与饲料混和，具有剂量不准确的缺点，而且常会影响吸收，降低受试物的毒性。

为了便于染毒常需用溶剂来溶解受试物或将其配成混悬液，溶剂本身应无毒，且不与受试物起反应。灌胃容积一般大鼠不超过 3ml，小鼠不超过 2ml，当染毒剂量过大时，可分几次给药。

#### b. 经呼吸道染毒

将实验动物放在有毒气体或粉尘的染毒柜内进行染毒，急性吸入染毒采用静式染毒柜(25~50L)，加入定量受试物形成所需浓度的空气环境，让动物自由吸入，染毒 2~4 小时。

#### c. 经皮肤染毒

本法主要用于化学物如化妆品、农药经皮肤吸收所引起的急性毒性。常用动物是成年家兔或豚鼠，有时也用于大鼠或小鼠。在正式给药前 24 小时，给动物背部脱毛，注意勿伤皮肤。将受试物均匀涂于皮肤表面，用纱布复盖，共敷 24 小时。

### 3) 剂量与分组

首先应根据受试物的结构对比文献中类似化学物的致死量作初步估计，然后进行预试以找出粗略的LD<sub>0</sub>和LD<sub>100</sub>。正式试验可在LD<sub>0</sub>和LD<sub>100</sub>之间设 5~7 个剂量组，组间距以 1.2~1.5 倍为宜，每组动物 10 只，雌雄各半，使用兔或狗等大动物时不少于 4 只。

### 4) 观察与检查

染毒后不仅要检查动物死亡数和死亡时间，而且还要观察神经系统、呼吸系统等各系统的中毒表现包括其严重程度和持续时间，通常观察 7-14 天，以免迟发性反应被遗漏。

对死亡和存活动物应作大体解剖。存活 24 小时以上的动物，肉眼观察到的病变组织、器官需进一步作病理学检查。

## 5) LD<sub>50</sub>的计算与结果评价

计算LD<sub>50</sub>及其标准误的方法很多,通常采用冠氏法和机率单位法,根据所得结果,按前述急性毒性分级标准,评定其毒性大小。LD<sub>50</sub>值愈小,毒性愈大。

### (2) 急性非致死毒性试验

以死亡作为观察指标所得急性毒性的不足之处在于不能提供日常生活中常见的非致死毒性的安全界限,或对发生急性中毒的危险性估计提供依据。以下介绍几种测定化学物刺激作用的方法:

#### 1) 急性阈剂量(浓度)的测定

应根据化学物对机体作用的性质、实验目的和具体条件,选择适当的灵敏的观察指标。例如对于刺激性气体,可测定其刺激阈浓度或感官阈浓度。实验动物多用猫,选用健康动物数只,置于含有受试物的染毒柜内,染毒30分钟。观注并测得刚引起30%动物出现轻微刺激症状(流泪、流涕、流涎等)的浓度作为阈浓度。

#### 2) 局部刺激试验

许多化学物可引起接触的皮肤和粘膜的损伤作用,常采用皮肤和眼结膜刺激试验来评定其毒性。

急性皮肤刺激试验多选用健康成年家兔或豚鼠,至少4只。按前述皮肤染毒法去毛,取受试物0.1~0.5ml(固态受试物用水或赋形剂配制)涂在一侧皮肤上,另一侧涂赋形剂作对照,敷用4或24小时,去受试物后1、24、48和72小时观察涂抹部位反应,按皮肤刺激反应积分评定刺激强度(见表8-5和表8-6)。

急性眼刺激试验 将液态或软膏受试物(0.1ml或100mg)滴入或涂入实验动物一侧眼结膜囊内,另一侧眼作为对照。于6、24、48和72小时后观察局部反应,第4、7天观察恢复情况,观察时可用荧光素钠检查角膜损害。

## 2. 蓄积性和耐受性试验

环境化学物的蓄积作用是慢性中毒的基础。某些物质以较小剂量反复作用于机体,可使机体对该物质的反应性增强,即一次染毒不引起明显中毒反应或死亡的剂量,经分次重

红斑形成	积分	水肿形成	积分	总分	复染毒后,可引起明显的中毒或死亡,此种现象称为蓄积作用(accumulation)。
无红斑	0	无水肿	0	0	
勉强可见	1	勉强可见	1	2	
明显红斑	2	皮肤隆起轮廓清楚	2	4	
中等~严重红斑	3	水肿隆起约 1mm	3	6	
紫红色红斑并有焦痂形成	4	水肿隆起超过 1mm 范围扩大	4	8	
强度		总 分 值			
无刺激性		0~0.4			
轻度刺激性		0.5~1.9			
中等刺激性		2.0~5.9			
强刺激性		6.0~8.0			

可分两种:一是量的蓄积,即毒物在体内的排出量小于进入量,以致毒物在体内的贮留量增加称为物质蓄积(material accumulation);二是毒物进入机体后,并未发现在体内明显贮留,但可引起机体功能改变的逐渐累积,导致对该毒物的反应性增强,称为功能蓄积(functional accumulation)。但两者的划分是相对的,既有差别,又互有联系。耐受性(tolerance)是机体多次接触化学物质后,对该物质产生反应性减弱的现象,显示不易发生慢性中毒。有的学者认为耐受性是适应反应的另一种形式,但不是真正的适应,而是中毒过程的一个阶段。

#### (1) 蓄积性试验

蓄积作用的测定方法有多种, 现仅介绍常用的蓄积系数法, 这是一种生物效应测试法, 方法简便, 但不能区分是功能蓄积, 还是物质蓄积。蓄积系数 (cumulative coefficient, kcum) 是指多次染毒使半数动物出现某种效应或死亡的总剂量 (ED<sub>50</sub>(n)) 与一次染毒引起同一效应的剂量即半数效果 (ED<sub>50</sub>(1)) 的比值:

$$K_{cum} = ED_{50}(n) / ED_{50}(1)$$

通常以死亡为观察的效应, 则

$$K_{cum} = LD_{50}(n) / LD_{50}(1)$$

根据 Kcum 的大小可将蓄积作用分为 4 级 (见表 7-7)。测定 Kcum 的方法常用的有下列三种:

### 1) 固定剂量法

由Kagan和Stankevic(1964)提出, 该法固定每天染毒剂量为 1/10LD<sub>50</sub>, 连续染毒, 直至实验动物半数死亡; 如果染毒剂量累计已达 5 个LD<sub>50</sub>, 动物死亡仍未达半数, 实验即可结束, 计算蓄积系数, 作出评价。

### 2) 递增剂量法

由Lim等(1961)提出, 先测出LD<sub>50</sub>(1), 然后对另一组动物每天染毒, 以 4 天为一期, 开始给予 0.1LD<sub>50</sub>(1), 以后每期按 1.5 倍递增剂量, 直至动物半数死亡, 或实验已达 24 天, 动物死亡未达半数 (此时总剂量已达 8.3LD<sub>50</sub>(1)), 可结束实验, 计算蓄积系数。

蓄积系数	蓄积作用
<1	高度蓄积
1~	明显蓄积
3~	中度蓄积
5~7	轻微蓄积

### 3) 二十天试验法

本法是我国“食品安全性毒理学评价程序”(1984)针对上述两法的利弊而提出的。选用大鼠或小鼠,每个剂量组雌雄各10只,以1/2、1/5、1/10、1/20LD<sub>50</sub>分别对每组进行染毒,每日一次,共20天。如1/20LD<sub>50</sub>组动物有死亡,且有剂量-反应关系,则有较强蓄积作用;如1/20LD<sub>50</sub>组无死亡,则无明显蓄积。

现已发现不少化学物如有机磷农药用上述方法测定,属于轻度蓄积的一类物质,仍可导致慢性中毒。为此,有人主张不仅要考虑以死亡为指标的蓄积系数,而且也要考虑某些生理、生化等反映机体功能障碍的指标,作为蓄积作用的观察效应,即应用ED<sub>50</sub>(n)/ED<sub>50</sub>(1)测定蓄积系数,可以更敏感地反映化学物的蓄积作用。

## (2) 耐受性试验

对动物耐受性的观察多在蓄积性试验结束后,如果剂量已远超过5个LD<sub>50</sub>,死亡动物未超过半数,说明该物质蓄积性很低外,也可能机体已产生耐受性。为此,可对尚存活的动物给予一个LD<sub>50</sub>的打击剂量,并观察动物死亡情况,如死亡率明显低于对照组,表示已产生耐受性。

## 3. 亚急性、亚慢性和慢性毒性试验

在日常生活环境中,人群接触化学物的浓度远低于急性致死浓度,但接触的时间则较长。因此,为了评价在较长时间内接触低浓度化学物的毒性作用,需进行亚急性、亚慢性或慢性毒性试验。

### (1) 亚急性和亚慢性毒性试验

亚急性和亚慢性毒性试验是指在较短时间内多次重复染毒条件下,研究化学物质的毒性作用。染毒期对大、小鼠一般为1~3个月,有的研究者采用更短的时间,2周至1个月,称为亚急性毒性试验(subacute toxicity test),染毒3个月的称亚慢性毒性试验(subchronic toxicity test)。亚急性或亚慢性毒性试验的目的是在急性毒性试验的基础上,在较短时间内了解受试物对机体的主要毒性作用及其靶器官,探讨敏感的观察指标和剂量-反应关系,为慢性毒性试验设计提供依据。

#### 1) 动物选择

常选用两种以上的初成年动物,最好所选用的动物对受试物的生物转化方式与人基本相同。一般首选大鼠,每组10~20只。兔、狗等较大动物,每组不应少于4只,雌雄各半。

#### 2) 实验期限

试验期限(月)	大鼠		家兔		狗		猴	
	寿命%	相当于人类的时间(月)	寿命%	相当于人类的时间(月)	寿命%	相当于人类的时间(月)	寿命%	相当于人类的时间(月)
1	4.1	34	1.5	12	0.82	6.5	0.55	4.5
2	8.2	67	3.0	24	1.6	14	1.1	9
3	12	101	4.5	36	2.5	20	1.6	13
6	25	202	9.0	72	4.9	40	3.3	27
12	49	404	18	145	9.8	81	6.6	53
24	99	808	35	389	20	162	13	107

实验持续期限应视实验目的和动物种类而定，由于人和动物的寿命差异，对不同种类动物要求的期限也不同。一般为实验动物寿命的10%左右。表8-8所列几种常用实验动物染毒时间占动物寿命的百分比及相当于人类寿命的时间，可供参考。

### 3) 剂量分组

一般选用  $1/20 \sim 1/5LD_{50}$  作为亚急性或亚慢性试验剂量，对于在体内不产生蓄积作用而排泄又快的物质还可适当加大剂量，反之则可减少剂量。一般至少设三个剂量组，要求在实验结束时，最低剂量组的动物不会产生可观察到的毒性反应；最高剂量组要求能引起动物明显的反应，但又不引起动物死亡；中间剂量组应产生轻微的毒性反应，还应设立对照组。

### 4) 染毒方式

应与人实际接触的方式尽可能一致。对气体和挥发性物质可采用吸入染毒。农药、重金属及各种能接触水和食物的化学污染物，采用经口染毒，常用灌胃法，也可将化学物加入水中，让动物自由饮用，但对有气味、挥发性或刺激性的物质应用灌胃法。

### 5) 观察指标

应根据受试物的毒作用特点，选用最敏感的指标。但血、尿常规，肝、肾功能及病理组织学检查应列为常规检查。常用的观察指标有：

#### a. 一般性指标

如动物体重增长率、食物消耗率、活动能力等，这些指标的变化是实验动物对化学物毒性的整体反应。体重明显下降常常是中毒或疾病的信号，也是一项比较敏感的指标。

#### b. 特异指标

用以测定化学物作用于机体后所引起的特异性反应。因此，它能更确切地阐明该物质对动物产生有害影响的阈剂量(浓度)及最大无作用剂量(浓度)。因此，应尽量选用特异指标。例如有机磷农药染毒可测定胆碱酯酶活性，芳香族硝基化学物染毒可测定高铁血红蛋白；无机氟染毒可检查斑釉发生率及牙齿和骨氟含量。但有些特异指标并不一定比非特异指标敏感，例如高级神经活动机能指标(食物运动和防御条件反射等)，免疫反应指标(唾液溶菌酶、白血球吞噬机能、血清免疫球蛋白水平)等。但也有人认为，一些生理学方法虽敏感，但所测得的机能改变，难以确证受试物对机体的有害作用。

#### c. 血液学检查指标

除常规检查外应根据化学物毒作用特点进行特殊项目的检查。如铅中毒时检查彩红细胞，必要时可检查骨髓细胞成分。

#### d. 肝、肾功能检查指标

肝功能检查主要是通过肝脏受损时可能释放至血清中的一些酶的测定来实现的，目前常用的有谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)及其同功酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GTP)等活性测定。但这些酶活性的增高也常受到其它器官病变的影响。

肾功能检查通常采用一般临床检验方法，也可采用血清尿素氮及其它肾功能试验。近年来有人主张测定尿中谷草转氨酶含量变化以反映肾小管上皮细胞坏死程度。

#### e. 有害物质在体内的分布、代谢及排泄指标

如生物材料(血、尿、毛发等)中有害物质(汞、镉、铅、砷、氟等)含量的测定，不仅可说明这些物质在体内的分布及排泄情况，而且为流行病学调查人体是否接触该化学物质提供诊断指标。有些化学物在体内经代谢后，大部分以代谢产物排出，则可测定其代谢物，如氰化物和有机腈化合物经代谢后，大部分以硫氰酸盐的形式从尿中排出。

#### f. 病理组织学检查

实验过程中死亡的动物应作病理检查，以排除其它致死原因。实验结束时应处死全部动物进行尸检。脏器系数常是一项比较灵敏的指标。病理组织学检查应特别注意靶器官的变化，但肝、肾等组织应列为常规检查项目，同时应对所见的病变程度作出定量分类，以便统计分析。

## (2) 慢性毒性试验

慢性毒性试验(chronic toxicity test)是检测在较长时间内,以小剂量反复染毒后所引起损害作用的试验。其主要目的是评价化学物在长期小剂量作用的条件下对机体产生的损害及其特点,确定其慢性毒作用阈剂量和最大无作用剂量,为制定环境中有害物质的最高容许浓度(MAC)提供实验依据。

实验动物常选用初断乳的大鼠、家兔或狗。每组动物数应视实验期间处死检查的批数及统计学分析的要求而定,一般大鼠每组 20~40 只,家兔 6~10 只,狗 4~6 只,雌雄各半。

慢性毒性试验的期限原则上应持续动物生命期的大部分时间。但有人分析了一些毒理学实验资料后认为,毒物所致的病理改变大部分在 6 个月以内出现,以后所增加的病理变化为数甚少,所以一般慢性毒性试验不需把期限拖得太长。大鼠、家兔一般为 6 个月,狗 6~12 个月。但对一些有明显蓄积作用的化学物,拟采用慢性毒性与致癌性联合试验,则应适当延长试验期限,如大鼠可延长到 1~2 年。

剂量分组原则上与亚慢性试验相同,一般设 3~4 个剂量组和一个对照组。因染毒时间长,确定剂量时应十分慎重,可根据亚慢性试验资料,取其最低引起中毒反应剂量的 1/20、1/10、1/5 或 1/1000、1/100、1/10LD<sub>50</sub> 作为慢性试验的剂量。

染毒方式和观察指标的选择原则同亚慢性试验,尽量选择在亚慢性试验中找到的特异和敏感指标。

## 4. 特殊毒性试验

环境化学物引起的致突变、致癌和致畸作用等危害与其它毒作用一样,也是毒物与机体相互作用的结果,但又有明显不同于一般毒性的特点,如后果严重,可影响子孙后代等,因而称之为特殊毒性,将其作为毒理学的特殊问题加以考虑。

### (1) 致突变试验

指鉴定环境污染物有无致突变作用。突变是一种遗传状态,可以通过复制而遗传的 DNA 结构的任何永久性改变称为突变。在环境毒理学中,通常所指的突变包括基因突变和染色体畸变。突变既可由诱变剂对 DNA 或染色体的损伤直接观察,也可按这些损伤所引起的后果,对某种酶的缺失或某种功能的改变,间接揭示发生的突变。由于细菌、酵母、植物细胞、昆虫和哺乳类细胞 DNA 的基本结构相似,它们都可用来建立致突变的测试系统,至今已建立了很多试验方法。目前已有的致突变试验方法 100 多种,但经常广泛应用于检测环境化学致突变物和潜在致癌物的方法不外 20 多种(表 6-10)。在致突变试验中,由于许多方法所观察的终点并不是直接反映突变,而是说明观察到产生突变这一过程中的某些现象,因此通常将观察到的现象所反应的某些改变(遗传学本质的改变)称为遗传学终点。致突变试验按其观察的遗传学终点分为基因突变、染色体畸变、原始

DNA 损伤三类。致突变试验的目的是确定化学物改变细胞内遗传物质的能力；确定其致突变与对哺乳动物的影响；对可遗传损伤、致癌性以及其它有关损伤进行评价或预测。

## 1) 基因突变试验

### a. 原核细胞微生物试验

常用的菌株是鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌。多数细菌致突变试验是检测回复突变，如Ames试验，即鼠伤寒沙门氏菌 / 哺乳动物微粒体试验是检测受试物诱发沙门氏菌突变型( $his^-$ )回复为野生型( $his^+$ )的能力。试验菌都是营养缺陷型、不能自行合成组氨酸，在缺乏组氨酸的培养基中不能生长。如果在受试物作用下，回复突变成野生型即原养型后就能生长成菌落，则计数培养基上的菌落数，即可判断受试物是否具有致突变性。

目前使用的标准菌株有四种： $TA_{97}$ 、 $TA_{98}$ 、 $TA_{100}$ 、 $TA_{102}$ ，前两者检测移码突变，后两者检测碱基置换突变，同时对移码突变也有感受作用， $TA_{102}$ 对醛类、过氧化物及DNA交链剂也较敏感。这些菌株带有一些附加突变和附加因素，如缺乏脂多糖以增加细胞壁的通透性，使大分子也能进入细胞。DNA分子上修复基因 $uvrB$ 缺失，使细菌DNA损伤的切除修复能力改变，从而对致突变物的作用更加敏感。

许多致突变物在未经活化前无致突变作用，因此常利用生物活化系统在体外进行试验，通常由大鼠肝微粒体混合功能氧化酶系统组成，先给动物以诱导剂(如苯巴比妥、多氯联苯等)以增加微粒体酶的活性，所制得的肝匀浆上清液置低温保存，使用时再加入微粒体酶转化作用所需的辅助因子，如辅酶II和葡萄糖-6-磷酸，此种混合液称S9，作为体外代谢活化系统。

判断阳性结果的标准为：试验组回变菌落数为对照组的两倍以上，有剂量反应关系和重现性，即可判为阳性。四种菌株中只要有一种得阳性结果，即可判断为鼠伤寒沙门氏菌的致突变物，仅当四种菌株均为阴性结果时，才能认为实验结果阴性。

本法简易、经济、快速，是当前应用最广的一项有效筛选环境致突变物和致癌物的方法。其不足之处是对某些化学物的敏感性和重现性较差。但随着方法的不断改造，如采用预培养法、波动试验等，提高了本试验的有效性，扩大了应用范围。

大肠杆菌回变试验采用色氨酸、乳糖营养缺陷型菌株( $trp^- / Lac^-$ )，经受试物作用后，如发生回复突变，成为野生型( $trp^+ / Lac^+$ )，就能在缺乏色氨酸的培养基上生长，据此检测受试物的致突变性。本法是细菌回复突变试验中仅次于Ames试验的一种简单、快速、灵敏和应用广泛的检测方法。

### b. 真核微生物试验

真核微生物具有染色体，不仅可用于检测基因突变、而且还可检测染色体损伤，已建立了某些株的酵母菌、裂殖酵母菌、红色链孢霉菌和构巢曲霉菌的测试方法，主要用于检测回复突变(reversional mutation)，少数也可用于正向突变(forward mutation)。常用的真核微生物如酿酒酵母可用于检测基因突变、有丝分裂交换、基因转换和染色体不分离，这是原核细胞所不及的，酵母还具有细胞色素P-450活化系统，一般可不需加S9活化。

常用的酿酒酵母菌株有D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>、D<sub>5</sub>、D<sub>6</sub>、D<sub>7</sub>、JD<sub>1</sub>等，可利用一些酿酒酵母的突变型需要腺嘌呤、并产生红色菌落，而野生型腺嘌呤生成白色菌落来检测回复突变；D<sub>3</sub>、D<sub>5</sub>可检测有丝分裂互换；D<sub>4</sub>、D<sub>7</sub>、JD<sub>1</sub>可检测基因转换；D<sub>6</sub>用于检测染色体不分离。现已有不少学者用酵母试验检测了数百种化学物，包括环境污染物、农药、染发剂等。本试验的主要特点是对某些致突变物作用不敏感，且缺乏统一的标准方法。

### c. 昆虫试验

果蝇是最常用的昆虫，与微生物相比其优点在于对毒物的代谢方式与哺乳动物相似，繁殖周期短，其饲养简单，费用较低。因此常用于检测化学物对生殖细胞的致突变性，包括伴性隐性致死试验，显性致死试验以及性染色体缺失和遗传易位试验。

果蝇伴性隐性致死试验的原理是根据隐性基因在伴性遗传中是交叉遗传的特征，用以测定雄性亲代接触受试物后，对第二代(F<sub>2</sub>)雄蝇的致死作用。先使雄蝇接触受试物，以诱发X染色体的隐性致死突变，传给F<sub>1</sub>代雌蝇为杂合性，不表达，但在F<sub>2</sub>代雄蝇中为半合性，能表达出来。如给野生型雄蝇(红色圆眼)染毒后，与雌蝇(黄色棒眼)交配，如果亲代雄蝇染色体上的基因发生隐性致死突变，就能在F<sub>2</sub>代雄蝇中表达，即F<sub>2</sub>代中没有红色圆眼雄蝇。本法的缺点是工作量较大，对某些化学物如芳香胺与多环烃类不敏感。

### d. 哺乳动物细胞体外试验

近年来利用哺乳动物细胞体外培养方法检测化学物的致突变性已有迅速发展。常用的细胞有中国仓鼠肺细胞(V<sub>79</sub>细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y)和人成纤维细胞或淋巴细胞。这类细胞生长迅速，接种率高，可以有正向突变和回复突变，而且突变体对营养、生化和耐药性有选择反应，最常利用的是以其抗药性作为其正向突变的检测终点。

常用的基因位点有：次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶，胸苷激酶及Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP酶位点。前两种酶是细胞中这两个位点执行正常功能的产物。在正常情况下，当存在嘌呤类似物，如6-硫代鸟嘌呤(TG)和6-巯基嘌呤(MP)或嘧啶类似物，如5-溴脱氧尿嘧啶(Brdu)时，经次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶和胸苷激酶的作用，产生异常的嘌呤或嘧啶核苷酸可杀死细胞。因此正常细胞在含嘌呤或嘧啶的培养基中不能生长。但当受试物使这两个位点发生突变时，则突变型细胞能产生对上述碱基类似物的抗药性而仍可在此种培养基中继续生长。因此可根据细胞生长情况检测化学物的致突变性。

$\text{Na}^+ / \text{K}^+$ ATP酶也是该位点的正常基因产物，乌本苷可使该酶失活而导致细胞死亡，当受试物使该位点发生突变时，可对乌本苷产生抗性而细胞继续存活。

#### e. 小鼠基因突变试验

主要包括特定座位试验和小鼠点试验。特定座位试验首先是使野生型小鼠接触受试物，然后与多隐性基因的鼠种进行交配，如果受试物能使其等位基因发生突变，则其相应的隐性基因能于出生后表达出来，其突变的后代在毛色、毛的结构、眼的颜色和耳的长度等的表型上有改变。本法的优点是在整体动物身上直接检测受试物对生殖细胞的致突变作用，也是目前对哺乳动物诱发可遗传基因突变的主要方法。其缺点是仅有几个隐性基因座位可使用，因此要判断阴性结果需要大量的动物。

小鼠点试验用于检测经胎盘吸收受试物后所引起的胚胎体细胞基因突变。其基本步骤是给妊娠小鼠受试物，这种小鼠的胚胎在特定的毛色基因座位上是杂合子，可检查其新生仔鼠被毛上镶嵌样的颜色斑点，这种色斑表明有突变细胞克隆的形成。本试验比较经济，几周内可以完成。虽有假阳性，但尚未发现有假阴性结果。因此点试验可以作为哺乳动物遗传性细胞突变的一种有效预筛方法。

### 2) 染色体畸变试验

#### a. 哺乳动物细胞染色体畸变试验

是直接观察在致突变物作用下，生物体中期相细胞染色体结构和数目的改变，又称细胞遗传学试验。本试验可在体细胞或生殖细胞进行，也可在体内或体外进行，因细胞染色体效应除具有本身的遗传学意义外，与基因突变也有密切的相关。因此它是检测人类遗传损伤的可靠方法，可广泛用于研究接触致突变物的人群或动物细胞染色体损伤。

体外试验：常用的细胞取自小鼠淋巴细胞，中国仓鼠卵巢细胞或人外周血淋巴细胞，以合适的培养基进行培养，加入植物凝集素(PHA)以促进细胞分裂。然后以不同浓度的受试物处理，加或不加代谢活化系统，并设阴性或阳性对照，可用乙基甲基磺酸酯(直接诱变物)或二甲基硝基磺酸酯(间接诱变物)，培养一定时间后加入秋水仙素以终止细胞分裂，制片、固定、染色、观察染色体结构变化。

体内试验：本法优点在于存在内源性活化系统。整体动物实验可提供多种组织进行研究，如骨髓细胞、脾脏和精原细胞；可用以检查接触化学物人群的遗传损伤。动物试验可将受试物给予小鼠或大鼠，常用骨髓细胞作检查。人体染色体畸变率分析常使用外周血淋巴细胞进行培养，可用于监测接触潜在致突变物的人群等。如有的学者对食用被甲基汞污染的鱼的人群进行调查，结果表明淋巴细胞的染色体畸变率与血细胞的总汞含量之间呈明显相关。

#### b. 微核试验

微核是由有丝分裂后期滞留的整个染色体或无着丝点断片所形成的核形小体,用以检测染色体完整性受损和染色体分离异常,它与同类细胞染色体分析的灵敏度基本一致,但比染色体分析法简单、省事、应用广泛。最常用的方法是小鼠骨髓多染红细胞(PCE)微核试验。试验于动物处死前30小时和6小时染毒两次,从胸骨或股骨取新鲜骨髓制备细胞标本、染色,每只动物计数1000个PCE,求出含微核细胞的千分率,与阴性对照比较,有显著差异者为阳性。Heddle(1983)提出两次染毒相隔24小时,于第二次染毒后24小时和48小时分批处死取样的方法,可提高微核检出率。

近年来已发现多种其他靶组织和生物体细胞可用于检测微核,如小鼠外周血正染红细胞(NCE)。检查受孕小鼠胎仔肝、脾PCE还可研究受试物能否通过胎盘诱发染色体损伤(胎盘转移微核试验)。Heddle还提出体外微核试验方法,常用的细胞有人、鼠外周血淋巴细胞、CHO细胞、V<sub>79</sub>细胞等。本法可使受试物直接作用于靶细胞,提高了直接致突变物的阳性率。

常规的微核试验难以区分染色体断裂和非整倍体诱变剂所形成的微核。Degrassi等(1988)将免疫荧光染色技术用于体外培养细胞的微核试验。通过微核细胞着丝粒断片阳性率的检测,将微核的两种来源区分开来,从而可简便、快速地用于非整体诱变剂的检测。

近年来应用植物细胞如紫露草、蚕豆根尖细胞等微核技术,检测水环境中污染物的诱变性已受到广泛重视。1985年WHO国际化学品安全纲要(IPCS)采用了紫露草微核检测法,1986年我国国家环保局正式把紫露草与蚕豆根尖微核方法列为水环境诱变剂的监测项目。本法的优点是:它能反映多种环境因素对机体的综合影响,符合实际情况;技术简易、快速、经济、易于推广,特别适合于环境监测,如大气、水体、土壤污染等,其不足之处是植物与人在生理、代谢等方面相差很远,损伤的表现也有差异;不同种类植物对诱变物的敏感性、假阳性等问题尚待阐明。但是随着测试技术的改进与环境监测工作的需要,预计本法有较广的应用前景。

#### c. 显性致死试验

本试验用以检测化学物对雄性动物生殖细胞的致突变性。常用实验动物为小鼠,首先给雄鼠染毒,然后使其与雌鼠交配。如果受试物具有致突变性,可使雄鼠生殖细胞的染色体发生改变而引起胚胎死亡,计算出每只受孕母鼠平均胚胎死亡数与对照组比较,以确定受试物是否具有致突变作用。

本法在哺乳动物体内进行,不需特殊设备条件,结果容易观察,是一种较为实用的方法。但因其以死亡为指标,其灵敏度较差,且所需动物较多,费用较高。

#### d. 小鼠遗传易位试验

本试验是检测雄性生殖细胞染色体相互易位的可遗传性。以染毒的雄性小鼠的子1代与未经染毒的雌鼠交配,其染色体损伤效应表现为活胎数减少。这是因为带有易位杂合子的雄性子1代带有一对已发生相互易位的可遗传同源染色体,在减

数分裂中,产生重复/缺失的配子,引起胚胎早期死亡。本法的优点是能检测可遗传损伤。这种能遗传给后代的改变对基因库的损害比显性致死和其他非遗传易位性染色体改变更为严重。

### 3) DNA 损伤与重组试验

#### a. 细菌 DNA 修复试验

**枯草杆菌重组试验** 细菌受到不同类型的DNA损伤后,可导致细胞突变,甚至死亡。但大多数可通过细胞修复活动得到修复。如果修复过程有缺陷(重组缺陷、聚合酶缺陷等),受损的DNA不能恢复正常,可导致细胞死亡。本试验以DNA损伤后重组修复缺陷为测试终点。采用具有修复功能的野生型菌株( $rec^+$ )和重组功能有缺陷的菌株( $rec^-$ )同时接触受试物,如果发生DNA损伤,则 $rec^-$ 菌株较 $rec^+$ 菌株易于死亡。利用两菌株在受试物作用下生长受抑制的差异,就能判明受试物是否对DNA有损伤。常用的菌株为 $H_{17}(rec^+)$ 和 $M_{45}(rec^-)$ ,试验方法有标准划线法、冷培养法和标准芽胞法,后两种方法更为敏感。

本试验简便、快速、灵敏,可用于初筛试验,尤其适用于金属、农药等化学物的致突变性检测。

**大肠杆菌修复试验** 本法的基本原理与枯草杆菌重组实验相同。常用的菌株有DNA聚合酶缺陷型( $Po1A^-$ )和野生型( $Po1A^+$ )以及多种修复功能缺陷型( $CM871uvrA^-$ ,  $rec A^-$ ,  $LexA^-$ )和野生型( $WP_2uvrA^+$ ,  $rec A^+$ ,  $Lex A^+$ )。测定方法有纸片扩散法、平板掺入法和液体法。

#### b. 程序 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS) 试验

在正常情况下,细胞内DNA的合成主要是在S期进行的,如果致突变物作用于细胞,使DNA损伤,为了达到修复的目的,细胞在S期以外进行DNA合成,这种合成处在正常合成程序之外,故称之为程序外DNA合成,因此,只要发现UDS增加,就表明曾发生过DNA损伤。与其它致突变试验相比,UDS试验是相对非特异性的,具有广泛的敏感性。本试验常以同位素标记的碱基(如 $^3H$ -胸苷)掺入DNA的量来显示DNA合成的量。可用放射自显影技术或液体闪烁计数法进行测定。常选用的细胞有大鼠原代肝细胞和人体细胞如人成纤维细胞、Ha1a细胞或外周血淋巴细胞等,也可将受试物给大鼠染毒,然后分离肝细胞进行UDS试验。

#### c. 姊妹染色单体交换(SCE) 试验

SCE是指一个同源染色体内,两个染色单体之间DNA复制产物发生互相交换,可能与染色体断裂和重接有关,表明DNA曾受损伤。细胞在含有5-溴脱氧嘧啶(BrdU)的培养基中生长时,BrdU可取代胸腺嘧啶参入到新合成的DNA链中,经两个分裂周期后,两条姊妹染色单体中参入的BrdU量不等,一条单体的DNA双链均为BrdU所取代,而另一条单体中仅有一条链为BrdU取代,从而出现一深一浅的差别。当发生SCE时,可根据每条染色单体内染色深浅转变点的数目,计数该染色体的SCE数目,见图8-5。

体外试验常用的细胞有人外周血淋巴细胞和中国地鼠卵巢细胞等。细胞的培养、染毒过程同染色体畸变试验。在培养 2h 后,加入 BrdU,然后在暗环境下继续培养 72h,加秋水仙素,收获细胞,制备染色体标本。每个剂量至少观察 25 个中期细胞,计算出每个细胞的平均 SCE 数,与对照组比较,有显著

性差异,并呈剂量-反应关系时,可判为阳性结果。

体内试验与体内染色体畸变试验相似,但需给动物注射或皮下包埋 BrdU。常用的组织为骨髓、其次为胸腺、脾和精原细胞。本法也可检查接触化学物质的人或动物,采取外周血样,与 BrdU 一起培养,以检测 SCE 频率。

SCE 试验与染色体畸变试验相比,在较低的受试物浓度下仍可检出 SCE 频率的增加。因其具有方法简便、快速、灵敏等优点,还可用于人群监测,现已广泛用于筛选环境化学致突变物。

#### d. SOS 显色试验(SOS chromotest)

Quillardet(1982)报导了一种用于检测环境中致突变物,即遗传毒物的新方法,称 SOS 显色试验。本法是一种检测 DNA 损伤的试验,基于 DNA 损伤剂诱导大肠杆菌的 SOS 反应,并通过测定 PQ35、PQ37 菌株中 *sfiA* 基因的表达水平,即诱导半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)的生成量来判断 DNA 受损伤的程度。1985 年 Oda 采用带有 *umuC*-'*lacZ* 融合基因的 PSK1002 质粒导入 TA1535 的重建菌株作同类试验,使试验效果有进一步改善。本法具有简便、灵敏、快速,基本上无假阳性的优点。现已用于检测环境致突变物和潜在致癌物,特别适用于成份复杂,含有各种有机物的环境样品,如大气颗粒提取物、工业废水、污水以及尿、血清等,因此具有较大的实用价值。

#### (2) 致畸试验

是鉴定有害物质是否具有致畸作用的方法。在制定环境中有害物质最高容许浓度的毒理学试验中,致畸试验的目的在于确定该物质是否具有致畸性,并探索其阈浓度,以便为制定环境卫生标准提供参考依据。

致畸试验常采用小鼠、大鼠和家兔等实验动物。试验时首先使受试动物受孕,而且必须掌握受试动物的胚胎发育的器官形成期。因给药时间很重要,过早给药将影响受精卵着床;过迟给药,胚胎发育已基本成熟,而不能充分显示其致畸作用。为了掌握好给药时间,应在雌雄动物合笼后每日检查阴道,并确切记录阴道出现精子或阴道栓的日期,以此作为实验动物受孕的第一天,由此推算实验动物胚胎器官形成期(表 8-10),并在这段时间内将受试物以不同剂量给予受试动物,

以求得剂量-反应关系。直至实验动物分娩前 1~2 天, 将孕鼠处死剖腹, 检查活胎、死胎、胚胎吸收数, 主要观察成熟胎仔的外观, 内脏和骨骼有无畸形, 与对照组比较, 作出评价。

动物	开始着床 (日)	器官形成(日)		妊娠时间 (日)
		开始	大部完成	
大鼠	5~6	9	17	21~22
小鼠	4~5	7	16	20~21
兔	7~8	7	20	30~32
豚鼠	6~7	11	25	65~68
狗	13~14	14	30	60~65
猴	9~11	20	45	164~170

表 8-11 体外致畸试验方法

测试系统	观察胚胎发育的阶段	测试终点
全胚胎培养  1. 哺乳动物着床前  2. 啮齿类动物着床后	胚胎 2-8 个细胞培养至胚泡阶段  胚胎早期体节阶段, 培养 1-4d, 常为 2d。器官形成期 整个发育期或器官形成期 整个发育期  整个发育期	细胞死亡、形态改变发育迟缓、细胞遗传学及生物化学改变 生存力、胚胎生长发育、胚胎及器官形成及分化(胚胎外组织发育和分化) 卵死亡, 畸形及发育迟缓 死亡, 特异畸形, 发育迟缓、孵化延迟或功能异常 死亡、发育状态、色素沉着、肉眼异常 生存力、成蝇发育异常(翅及鬃毛缺陷) 水螅细胞再聚合和分化的形态改变

<p>3. 鸡胚(卵) 培养</p> <p>4.鱼胚培养</p> <p>5.蛙胚培养</p> <p>6.昆虫(果蝇)</p> <p>7.水螅</p>	<p>整个变态期(从卵经第三令期到中角形成)</p> <p>成年水螅或人工水螅胚胎(分割成年水螅形成的细胞团)</p>	
<p>器官培养</p> <p>1. 肢芽(啮齿类及鸟类)</p> <p>2. 腭棚</p> <p>3. 牙蕾</p> <p>4. 晶状体</p> <p>5.胰腺</p> <p>6.性器官</p> <p>7.肾脏</p> <p>8.甲状腺</p>	<p>器官形成后期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p>	<p>形态发生, 软骨及肌肉形成</p> <p>上皮融合、细胞死亡和腭骨密合及转动</p> <p>牙发育、牙蕾组织学发生及形态学分化</p> <p>分化, 组织发生形态</p> <p>腺泡发育、形态及生化性质变化</p> <p>性器官发育、生殖细胞成熟, 副性腺发育及细胞形态</p> <p>形态和组织分化及生化性质变化</p> <p>甲状腺的组织形态学及功能改变</p>
<p>细胞培养</p> <p>1. 小鼠卵巢肿瘤细胞(MOT)</p> <p>2. 人胚间质细胞(HEPM)</p> <p>3. 肢芽细胞</p> <p>4.神经组织(神经嵴及中脑细胞)培养</p>	<p>无</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p> <p>器官形成期</p>	<p>细胞存活及贴瓶</p> <p>细胞生长及抑制</p> <p>细胞分化抑制(细胞生化改变), 生长及毒性</p> <p>细胞分化抑制(细胞生化改变), 生长及毒性</p>

近十年来体外致畸实验方法发展很快, 主要用于研究致畸作用机理和筛选化学致畸物。由于对化学物致畸机理了解得很少, 而发育过程又包括了复杂的增生和分化过程, 故目前已建立的外来致畸体外短期测试方法所监测的各类终点主要涉及到胚胎的正常发育而非异常发育。其终点包括细胞死亡、细胞间相互作用的变化、细胞迁移、生物合成障碍、生物化学和形态学分化改变及生长抑制等。体外致畸试验省时、省力、经济并可用来测试复杂化学混合物, 利用暴露人群生物材料如血浆、血清等进行测试, 这对于预测人类致畸效应是十分有用的。体外致畸实验方法很多, 主要包括体外全胚胎培养, 器官培养和细胞培养三个层次的试验(表

8-11)。体外致畸试验作为致畸作用机理研究是毋庸置疑的，作为致畸物筛选试验还有待进一步完善。

### (3) 致癌试验

是检测某种环境污染物的致癌性及其作用强度，目前采用的检测方法有短期筛选试验。哺乳动物短期致癌试验和长期动物致癌试验等。

#### 1) 体外短期试验

其目的是确定环境中有害物质是否与 DNA 进行共价反应和诱致遗传改变，用于对有害物的致癌性进行筛选。

现行的大多数短期试验用原核生物、低等真核生物、哺乳动物细胞和低等小动物中明确的遗传标记为其终点。按其所用终点可将这些短期试验分为三类：

第一类 DNA 损伤试验，包括与 DNA 的共价结合，诱致 DNA 的断裂或修复，诱导细菌的噬菌体，以及能修复和不能修复 DNA 的成对细菌株的不同存活能力等。

第二类基因突变试验，测量表型和 / 或遗传型的可遗传改变，包括检出一个基因产物的丢失或改变，检出生物功能由于正向或逆向突变而致的改变，以及检出基因的重组或改变(包括核基因组、线粒体基因组和含有病毒或质粒的基因组)。

第三类染色体效应试验，包括检出染色体数目和结构改变、SCE、微核和显性致死突变等。

美国环境保护局根据该试验已在 5 个以上实验室进行过验证，测试过 10 类以上和 150 种以上的化学物，测试结果重现性较好，每年试验使用次数在 50 次以上等标准，将以下试验定为常规短期试验（见表 8-12）。

试验名称	试验材料	试验性质		检出损伤			
		体内	体外	基因突变	染色体畸变	DNA 直接损伤	对生殖细胞危害
Ames 试验	细菌		+	+			-
大肠杆菌回变试验	细菌		+	+			-
大肠杆菌 DNA 修复试验	细菌		+			+	-
果蝇伴性隐性致死试验	昆虫	+		+			+
染色体分析	哺乳类细胞		+		+		-
SCE(所有 SCE 试验)	哺乳类细胞		+			+	-
V <sub>79</sub> HPRT 突变试验	哺乳类细胞		+	+			-
骨髓细胞染色体分析	啮齿动物	+		+			-
骨髓细胞微核试验	啮齿动物	+		+			-
显性致死试验	啮齿动物	+		+			+

利用遗传毒性试验来筛检致癌物存在不肯定性。如果按遗传毒性和致癌性进行分类，化学物质可分成遗传毒性致癌物、非遗传毒性致癌物、遗传毒性非致癌物及非遗传非致癌物四类。遗传毒性试验适合于检测遗传毒性致癌物及非遗传毒性非致癌物，故存在一定的假阴性(非遗传毒性致癌物)及假阳性(遗传毒性非致癌物)。因此，目前没有一个试验能单独检出所有已知的致癌物。这除了致癌物并非都是遗传毒性的外，另一个原因是化学致癌物代谢的复杂性，已知不同种属对致癌物反应的差异可能在很大程度上与代谢有关，这样具有不同代谢能力的试验在评价时就非常有价值。鉴于上述原因，故推荐用一组试验来筛检致癌物，以起到互补，防止漏检的作用。但对于如何组成最佳试验组，各个学者或研究机构认识不一，提出了不少组合方案，尚难取得一致。

在决定点方案中提出了以下试验组合:a. 细菌致突变试验, 首选 Ames 试验; 也可选用其它试验, 如 DNA 修复缺陷的大肠杆菌。b. 哺乳动物细胞基因突变试验, 其终点类似细菌致突变试验, 明确、易于判定, 同时它涉及的是更高级的真核细胞基因。最常用的为 V79 细胞株。c. 大鼠原代肝细胞 DNA 修复试验, 该试验反映化学物对 DNA 的损伤, 是一种特异反应, 和其它 DNA 效应不同, 它与化学物的毒性无关。该法灵敏、可靠, 具有代谢活化前致癌物的能力。d. SCE 试验, 这是检测遗传损伤中最快和最敏感的试验之一, 损伤的终点尚不清楚, 可能是发生在 DNA 复制叉的重组事件。由于它能提供在最高遗传组织水平的效应, 测定的客观性超过染色体的致断裂效应, 因此被包括在试验组中。e. 细胞转化试验, 通常不包括在遗传试验中, 因它不是以突变为终点, 但与致癌作用关系最密切, 故将其包括在该组合试验中。该试验是非必需做的, 因为还需使之标准化以及阐明该终点的意义。

## 2) 哺乳动物体内短期致癌试验

其目的是在不进行长期致癌试验的情况下为已有有限遗传毒性证据的化学物提供进一步证据, 包括致癌性、助癌性和促长作用等。目前有四个试验可供选择:

### a. 小鼠皮肤肿瘤诱发试验

试验所用的染毒途径为皮肤涂抹或皮下注射。染毒一次或多次, 20 周即可观察结果。如果给予受试物后还必需使用促癌物才能出现肿瘤, 说明受试物只有启动作用而无促进作用, 是不完全致癌物。相反, 在亚致癌剂量致癌物之后给予本身不致癌的受试物, 能出现阳性结果, 则受试物为促癌物。故本试验也可作为促癌试验使用。

### b. 小鼠肺肿瘤诱发试验

采用对肺肿瘤诱发特别敏感的 A/J 系小鼠作诱发肺肿瘤试验。所诱发的是肺泡源性腺瘤, 阳性结果不单表现为发生率增加, 而且有多发倾向。本试验染毒时间只需 30~35 周, 试验所得阳性结果往往能在长期动物致癌试验中得以验证。

### c. 大鼠肝脏转变灶诱发试验

是利用实验性肝癌与原发性肝癌的发生都有明显的阶段性, 其中癌前病灶能用酶组织化学技术来检测这一原理进行的。正常肝细胞中  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT) 活性极低不能检出, 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 和三磷酸腺苷酶 (ATPase) 活性较高, 而转变灶则表现为  $\gamma$ -GT 活性升高, G-6-Pase 和 ATPase 活性降低。另外, 还出现肝细胞对铁摄取能力降低, 故可利用其变化, 来判断肝脏转变灶的诱发, 这样可缩短试验周期, 如用肝脏致癌物一般在染毒 3 周即出现病灶, 12~16 周病灶增多。

### d. 雌性大鼠乳腺癌诱发试验

常用来检测多环芳烃等化学物的致癌性。因这类物质常可引起雌性大鼠乳腺癌发生率增高，而且在6个月内即可出现阳性结果，另外也有多发性倾向。该试验最大优点是肿瘤位于体表部位，能较准确判断发癌时间，因此可分析剂量与潜伏期之间的关系。

### 3) 长期动物致癌试验

是目前鉴定动物致癌物最可靠、应用最多的一种方法，这是因为化学致癌的一个特点是有较长的潜伏期，另外试验可严格控制影响因素，模拟人体的暴露条件。长期致癌试验主要用于测试：a. 在体内短期致癌试验中结果可疑的化学物；b. 虽然在体外和体内短期致癌试验中测试结果为阴性，但在人类中很可能有较高水平持续接触的化学物；c. 资料显示其可能的致癌作用是通过间接的非遗传毒性机理的化学物。

## (六) 快速计算方法

随着生产的发展，污染环境的新化学物质不断增多，现有常规制订卫生标准的方法特性、化学结构、感官作用阈和某些毒性参数之间具有一定的相关性，以此为基础，提出了用计算方法推算环境中有害物质的最高容许浓度，以满足某些特定条件下的实际需要。

前苏联是研究快速计算方法制订容许浓度最早的国家，并提出了一系列的计算公式。这些公式大体是以下列几方面的参数为其依据：①化学物质的某些理化性质常数，如分子量、沸点、熔点、蒸汽压等；②同系物化学结构生物活性；③毒性指标，例如LD<sub>50</sub>、LC<sub>50</sub>、阈浓度、蓄积系数等，ЛЮЮЛННА和ГАЛУБЕВ认为，在这些参数中，以毒性指标为根据提出的推算容许浓度的公式，远较以化学物质的理化参数和化学结构键的生物活性的计算公式推算的容许浓度准确，它更接近于前苏联颁布的国家卫生标准(表8-13)。

表8-13 居民区大气中某些化学物质MAC和其毒性参数的关系

物 质	LC <sub>50</sub> (mg/L)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	MAC <sub>最大一次</sub>		MAC <sub>日平均</sub>	
			苏联标准	推算标准	苏联标准	推算标准
			0.05	0.01	0.03	0.01
乙醛	20.0	1000	0.01	0.03	-	0.03
丙酮	100.0	8500	0.35	0.50	0.35	0.50
苯	51.0	6000	1.50	0.30	0.80	0.30
乙酸丁酯	40.0	8000	0.10	0.16	0.10	0.05

丁醇	17.0	4000	0.10	0.02	-	0.01
丁吸磷	1.0	500	0.10	0.003	0.01	0.003
二氯甲烷	65.0	600	3.00	3.00	1.00	1.10
二乙胺	12.0	75.0	0.05	0.06	0.05	0.06
二甲苯	30.0	3700	0.20	0.20	0.20	0.20
甲醇	150.0	10.000	1.00	0.40	0.50	0.40
吡啶	13.0	1500	0.08	0.10	0.08	0.10
甲苯	30.0	4000	0.60	0.20	0.60	0.20
环己醇	40.0	2000	0.06	0.20	0.60	0.20
环己酮	20.0	1000	0.04	0.16	0.04	0.16
氯甲代氯丙烷	6.0	200	0.20	0.30	0.20	0.30
乙酸乙酯	45.0	2700	0.10	0.30	0.10	0.30
乙醇	112.0	10.000	5.00	1.00	5.00	1.00

Г о л г њ н и к о в (1974) 提出多元回归方程式, 确定 $LC_{50}$ ,  $LD_{50}$ 与MAC之间有很高的相关性, 从而提出以下的公式:

$$\lg MAC_{\text{最大一次}} = 1.7 + 1.31 \lg LC_{50} - 0.31 \lg LD_{50} \text{ 式(8-1)}$$

$$\lg MAC_{\text{日平均}} = 0.7 + 1.71 \lg LC_{50} - 0.81 \lg LD_{50} \text{ 式(8-2)}$$

$$\lg MAC_{\text{日平均}} = 2.46 + 0.261 \lg LC_{50} + 0.321 \lg LD_{50} \text{ 式(8-3)}$$

А н д р е п е в а 根据测定嗅阈的简便性以及由嗅阈推算最高容许浓度值的准确性, 推荐下列公式:

$$\lg MAC_{\text{最大一次}} = 0.961 \lg XL - 0.51 \text{ 式(8-4)}$$

$$\lg MAC_{\text{日平均}} = 0.861 \lg XL - 0.79 \text{ 式(8-5)}$$

式中:XL 最敏感者嗅阈值

Андреева (1977) 对 99 种具有卫生标准的有机化合物分析其嗅阈值与最高容许浓度之间的相互关系, 故提出对具有气味的大气污染物卫生标准的推荐公式为:

$$MAC_{\text{最大一次}} = \text{嗅阈} / 5 \text{ 式(8-6)}$$

国内在制订有关的大气卫生标准时, 曾以实验结果来验证上述公式的准确性, 结果发现它们彼此之间十分接近。

[例 1]: 实验测定正己烷的嗅阈为  $320 \text{ mg} / \text{m}^3$ , 利用式(8-4)和(8-6)推算出其最大一次的最高容许浓度值分别为 74 和  $64 \text{ mg} / \text{m}^3$  (前苏联国家标准为  $60 \text{ mg} / \text{m}^3$ , 我国推荐标准为  $60 \text{ mg} / \text{m}^3$ )。

[例 2]: 实验测定大气中甲硫醇的嗅阈为  $3.7 \mu \text{g} / \text{m}^3$ , 按式(8-4)和(8-6)的推算值分别为 1.11 和  $0.74 \mu \text{g} / \text{m}^3$ , 它们和通过实验研究提出的卫生标准  $0.7 \mu \text{g} / \text{m}^3$ , 相当接近。美国在综合评价环境污染物危害程度时, 规定了以对健康影响为依据的环境容许浓度值。这些容许浓度值主要根据美国工业卫生工作者协会 (AGGIH) 制订的 TLV、LD<sub>50</sub> 或 LC<sub>50</sub>, 经过数学推导的公式计算出来的, 其公式如下:

#### 1. 推导大气污染物容许浓度的公式

$$C (\mu \text{g} / \text{m}^3) = \text{TLV} (\text{mg} / \text{m}^3) / 420 \times 10^3 \text{ 式(8-7)}$$

$$C (\mu \text{g} / \text{m}^3) = 0.107 \times \text{LD}_{50} (\text{mg} / \text{kg}) \text{ 式(8-8)}$$

$$C (\mu \text{g} / \text{m}^3) = 0.081 \times \text{LD}_{50} (\text{mg} / \text{kg}) \text{ 式(8-9)}$$

式(7-9)是考虑到特殊污染物在体内蓄积, 它用于生物半衰期  $\leq 30$  天的化学物质。

#### 2. 推导水中污染物容许浓度的公式

$$C (\mu \text{g} / \text{L}) = 13.8 \times \text{TLV} (\text{mg} / \text{m}^3) \text{ 式(8-10)}$$

$$C (\mu \text{g} / \text{L}) = 0.4 \times \text{LD}_{50} (\text{mg} / \text{kg}) \text{ 式(8-11)}$$

近年来, 为了定量研究与暴露环境毒物和职业毒物有关的健康危险性的需要, 发展形成了一门跨学科的方法学, 即危险度评估 (risk assessment)。在已知的暴露条件下, 通过危险度评估, 可以提供在空气、饮水中某种污染物的可接受浓度。然而在进行危险度评估中, 一个最重要的方面是区别两类毒物, 即一类是已知或假设具有反应阈值的毒物 (有时称为有阈值毒物), 一类是已知或假设无反应阈值的毒物 (有时称为无阈值毒物)。根据两类毒物引起健康效应的不同, 可以通过计算公式确定某种有害物质在空气、饮水中的可接受浓度。

#### 1. 对有阈毒物的可接受浓度计算 安全系数法

$$C = D_j / (I \cdot T) \text{ 式(8-12)}$$

式中：C 可接受浓度(剂量)

$D_j$  无作用剂量(mg)

I 摄入量，以每日人所需要的被污染的环境介质的单位表示

T 暴露时间(以日为单位)

关于 $D_j$ ，在两种情况下必须用最低的有效剂量来代替无作用剂量：得不到无作用剂量，但有关毒作用机理的知识表明是有阈的剂量-反应关系；有无作用剂量，但它是从一个有严重不足的研究中得出的、如暴露时间短、观察时间短，暴露途径不适宜或样本太小。

式(7-12)经代入各自参数后，可简化为：

(1)居民个体终生持续暴露空气中有毒物质的可接受浓度为：

$$C(\text{mg} / \text{m}^3) = D_j / (I \cdot T) = 1.9 \times 10^{-6} \times D_j \quad \text{式(8-12. 1)}$$

(2)居民个体终生每日暴露于饮水中有毒物质的可接受浓度为：

$$C(\text{mg} / \text{L}) = D_j / (I \cdot T) = 1.5 \times 10^{-5} \times D_j \quad \text{式(8-12. 2)}$$

(3)工人工作寿命期间从事相同工作时，其工作环境空气中某毒物质的可接受浓度为：

$$C(\text{mg} / \text{m}^3) = D_j / (I \cdot T) = 3.9 \times 10^{-6} \times D_j \quad \text{式(8-12. 3)}$$

对于从动物研究得出的数据， $D_j$ 可按  
下式计算：

式中： $D_j$  无作用剂量

$C_i$  浓度，以每单位污染介质(空气、水)中的mg表示

$I_i$  每日摄入污染介质的量：大鼠( $\text{m}^3 / \text{d}$ ) =  $0.105(W_1 / 0.113)^{2/3}$ ；小鼠

$$(\text{m}^3 / \text{d}) = 0.0345(W_1 / 0.025)^{2/3}$$

$W_i$  体重(kg)

推荐的安全系数

$F_1 = 1-10$  用以校正可能存在的种内敏感性变异

$F_2=1-10$  用以校正可能存在的协同作用

$F_3=1-10$  当选用的无明显作用水平(NOEL)、无明显损害作用水平(NOEL)或最小的明显损害作用水平(LOAEL)是根据不恰当的染毒途径而得出(吸入或经口)

$F_4$ =某种系数, 用来校正毒物通过所研究的介质的摄入量占总摄入量的百分比

$F_5=1$  或  $10$  在危险度分析时,  $F_5=1$ ; 在安全系数法计算可接受浓度时, 若以LOAEL, 代替NOEL或NOAEL时, 则 $F_5=10$

$F_6=1$  或  $10$  用以校正可能存在的种属间的敏感性差异( $F_6=1$  用于人体数值;  $F_6=10$  用于动物数值)

70 成人体重(以 kg 计)

$T_1$  暴露时间的中位数(年)

$E_1$  终生寿命(以年计)

$L_1$  潜伏期中位数(以年计)

74 人的寿命

$L$  人的某种反应潜伏期中位数(年计)

365 年的天数

对于从人的研究得出的数据, 可按下式计算 $D_j$

2. 对无阈毒物的可接受浓度的计算公式 危险度分析法  
(例如致癌物)

$$C=P / (R \cdot I \cdot T_3) \text{ 式(8-13)}$$

式中:C 可接受浓度

P 可接受危险度为  $10^{-6}$

R 危险系数

I 摄入量

$T_3$  暴露时间 =  $(74-L) \times 365$  日