

一种无溶剂饮水舱防腐涂料的毒性研究

李 姿, 王 伟, 胡嘉想, 秦光和, 赵青剑, 冯 丽, 刘 敏*

(云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022)

摘 要: **目的** 探讨一种无溶剂饮水舱防腐涂料的毒性作用。**方法** 急性经口毒性实验采用啮齿类动物急性固定剂量经口毒性实验一次限量法, 剂量设为 20000 mg/(kg BW)。微核实验设 5000、2500、1250 mg/(kg BW) 3 个剂量组、阴性对照组及阳性对照组, 采用 30 h 给受试物法, 检测骨髓嗜多染红细胞微核率。Ames 实验分别设每皿 200、100、40、10 μ L 共 4 个剂量组, 同时设阴性、阳性对照组, 采用平板掺入法, 观察每皿回变菌落数。**结果** 该种无溶剂饮水舱防腐涂料对受试动物的急性毒性(median lethal dose, LD_{50}) > 20000 mg/(kg BW)。与阴性对照组比较, 骨髓细胞微核试验结果为阴性。三七须根各剂量组在 Ames 实验中未呈现致突变性。**结论** 在本实验条件和剂量范围内, 该种无溶剂饮水舱防腐涂料对昆明种小鼠的急性经口毒性属实际无毒, 未见诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成的能力, 在 Ames 实验中未见呈现致突变作用。

关键词: 无溶剂; 防腐涂料; 急性毒性; 微核; Ames 实验

Toxicity of a solvent-free anticorrosive coating for drinking water tank

LI Zi, WANG Wei, HU Jia-Xiang, QIN Guang-He, ZHAO Qing-Jian, FENG Li, LIU Min*

(Yunnan Center for Disease Prevention and Control, Kunming 650022, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the toxicity of a solvent-free anticorrosive coating for drinking water tank. **Methods** The acute oral toxicity test was carried out in rodents at a fixed dose of 20000 mg/(kg BW). The bone marrow cells micronucleus test was divided into three dose groups: 5000, 2500, 1250 mg/(kg BW), negative control group and positive control group. The micronucleus rate of bone marrow polychromatic erythrocytes was detected by 30 h test. Ames test was divided into four dose groups: 200, 100, 40 and 10 μ L per dish, and negative and positive control groups were set up at the same time. Plate incorporation method was used to observe the number of revertant colonies in each dish. **Results** The median lethal dose (LD_{50}) of the solvent-free anticorrosive coating for drinking water tank to the tested animals was more than 20000 mg/(kg BW). Compared with the negative control group, the bone marrow cells micronucleus test results were negative. No mutagenicity of *Panax notoginseng* root was observed in each dose group in the Ames test. **Conclusion** Within the experimental conditions and dosage range, the solvent-free anticorrosion coating for drinking water tank is practically non-toxic to Kunming mice, and there is no ability to induce micronucleus formation of polychromatic erythrocytes in bone marrow of mice, and there is no mutagenic effect in Ames test.

KEY WORDS: solvent-free; anticorrosive coating; acute toxicity; micronucleus; Ames test

*通信作者: 刘敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。E-mail: 108616255@qq.com

*Corresponding author: LIU Min, Associate Chief Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China. E-mail: 108616255@qq.com

0 引言

饮水舱即饮用水舱,大多指船舶饮水舱,淡水舱和各种淡水柜等,大多采用碳钢、铝、钢筋混凝土等构成^[1]。以船舶饮水舱为例,船舶饮水舱目前以碳钢为主,因船舶长期处于海洋环境中,饮水舱空间狭窄、阴暗潮湿,钢铁极易腐蚀,饮水舱内的防腐工作变得尤为重要,因此饮水舱需涂覆防腐涂层,以保护舱室不受腐蚀,保持饮用水清洁^[2-3]。对应于饮水舱的涂料有耐盐性、耐水性、附着力、卫生等方面的要求。目前市面上用于饮水舱的防腐涂料有溶剂型涂料、高固体分涂料、水性饮水舱涂料及无溶剂涂料等等^[4-8],不同材质的防腐涂料都有其优缺点。我国目前各类饮水舱大多采用传统的溶剂型涂料,其挥发出的有机溶剂在环境、水质及人体的健康上均带来了一定程度的污染和不利于卫生安全的因素。近年来无溶剂饮水舱涂料作为一种不含挥发剂的液体涂料,慢慢受到了人们的重视。无溶剂饮水舱防腐涂料在防腐和环保要求较高的各类船舶饮水舱、淡水柜、食品容器内壁、压载水舱等方面得到广泛应用^[9]。但无溶剂防腐涂料在使用的过程中会析出有机物,对饮用水也造成潜在威胁。为了确保饮水舱涂料安全及可靠,必须对饮水舱涂料进行卫生鉴定及毒性评价。

本研究通过对小鼠的急性经口毒性实验、小鼠骨髓微核试验及鼠伤寒沙门氏菌实验(Ames实验),探索该种无溶剂饮水舱防腐涂料的毒性作用,为其安全使用提供毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

无溶剂饮水舱防腐涂料由云南昆明某公司提供,按《生活饮用水输配水设备及防护材料卫生安全评价规范》(2001)附录 A 规定的方法^[10],将涂料在玻璃板上制成100 mm×100 mm的双面样板。实验室取无溶剂饮水舱防腐涂料5片(200 cm²/片),按1000 cm²/L的比例,在25℃±5℃避光条件下完全浸泡于新鲜配制的浸泡水中,取第6次,浸泡240 h后的浸泡水作为受试物。

阳性药物叠氮钠(≥99.5%)、2-氨基苄(98%)、1,4-二羟基蒽醌(96%)、环磷酰胺(99%)(美国Sigma公司);敌克松(97%,美国International laboratory USA公司);鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株TA97、TA98、TA100和TA102及大鼠肝S-9(美国Moltox公司);姬姆萨染色液(珠海贝索生物技术有限公司);胎牛血清(美国GIBCO公司)。

MSC-ADVANTAGE 生物安全柜(美国Thermo Scientific公司);DM 5000B 生物显微镜(德国莱卡公司);SX-500 高压灭菌器(日本TOMY公司);DW-HL388 低温冰

箱(中科美菱公司);AE240 电子天平(瑞士METTLER TOLEDO公司);BF240 恒温培养箱(德国BINDER公司);DHG-9146A 干烤箱、DK-S28 恒温水浴锅(上海精宏公司);GENIUS 3 微量振荡器(德国IKA公司)。

1.2 实验动物

昆明种小鼠,无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号为SCXK(湘)2016-0002。饲料由四川省医学科学院,四川省人民医院实验动物研究所提供,合格证号:SCXK(川)2015-01。

环境条件:温度20~25℃,相对湿度40%~70%。动物房设施证号:SYXK(滇)K2015-0004。

1.3 小鼠急性经口毒性实验

参考经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)推荐的啮齿类动物急性固定剂量经口毒性实验方法(OECD TG 420)^[11]。选用体重18.2~20.2 g昆明种小鼠20只,雌雄各半,实验剂量为20000 mg/kg一次经口给予小鼠,观察14 d内小鼠的中毒表现及死亡情况,计算半数致死量(median lethal dose, LD₅₀)。

1.4 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验

分组及处理方法:50只健康昆明种小鼠,体质量为26.2~30.0 g,随机分成5组,每组10只,雌雄各半。分别取5000、2500、1250 mg/(kg BW)作为高、中、低3个不同剂量组,同时设阴性对照组(纯水)和阳性对照组(CP, 40 mg/kg)。阴性对照组和3个无溶剂饮水舱防腐涂料剂量组经口连续灌胃2 d,每日1次,阳性对照组采用腹腔注射连续染毒2 d,每日1次。骨髓制片:于第2次染毒6 h后,颈椎脱臼法处死小鼠,取股骨骨髓常规制片,吉姆萨染色,选择细胞着色适当、分散均匀的区域计数。每只动物计数1000个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE),并计数其中含有微核的细胞数,计算微核千分率。微核率(‰)=(含有微核的细胞数/嗜多染红细胞数)×1000‰。

1.5 Ames实验

选取经鉴定符合实验要求的4株鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株TA97、TA98、TA100、TA102进行实验,以大鼠肝S9混合液作为代谢活化系统。实验共设4个剂量组,无溶剂饮水舱防腐涂料浸泡液用0.22 μm PES滤菌器过滤除菌,各剂量组浸泡液浓度分别为每皿200、100、40、10 μL,同时设溶剂对照(灭菌蒸馏水)、阳性对照(敌克松、叠氮钠、2-氨基苄、1,4-二羟基蒽醌)及空白对照组。采用平板掺入法,每个菌株每个测试剂量均做3个平行皿,37℃下培养48 h后计数每皿回变菌落数。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析。骨髓微核率采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 小鼠急性经口毒性实验

实验表明,按实验剂量一次灌胃给予受试物后,14 d 内未见动物有明显活动异常及中毒表现,观察期间无实验动物死亡,表明该样品 LD_{50} 值大于 20000 mg/kg 体重,根据消毒剂毒性分级标准,该无溶剂饮水舱防腐涂料属实际无毒。

2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验

由表 1 可见,无溶剂饮水舱防腐涂料各剂量组 PCE / RBC 均在正常值范围内,未明显少于阴性对照组,说明该实验染毒剂量合适。阳性对照组微核发生率明显高于阴性对照组,差异具有显著性意义($P < 0.01$),表明实验结果可靠。无溶剂饮水舱防腐涂料各剂量组与阴性对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。结果表明,在本次实验条件下,无溶剂饮水舱防腐涂料无致小鼠骨髓微核作用。

2.3 Ames 实验

无溶剂饮水舱防腐涂料 Ames 实验结果见表 2。实验结果显示,在本实验条件下 4 个菌株的空白对照组自发回复突变菌落数均在正常范围内,各个剂量组在加与不加 S9 活化系统时回复突变数均未见明显增加,

未超过空白对照组的 2 倍及以上,亦无明显的剂量-反应关系,根据 Ames 实验结果判断,在本实验条件下,无溶剂饮水舱防腐涂料无诱导鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 4 个菌株 TA97、TA98、TA100 和 TA102 回复突变的能力。

3 结论与讨论

目前,国内饮水舱涂料包括溶剂型、高固体分、水性和无溶剂防腐涂料^[12-13],溶剂型涂料在密闭环境下干燥固化后溶剂难以挥发完全,不仅影响涂层的防护寿命,而且还会造成淡水的二次污染。同时,节能减排和“绿色环保”对涂料的性能和产业结构提出了更高要求。而无溶剂饮水舱涂料涂膜坚韧、附着力强、由于固体含量极高而大大降低了溶剂的滞留^[12],成膜后慢性挥发的物质较少,化学防腐性能优异,为饮水舱内的空气质量及防腐性能提供了基本保障。本研究通过对小鼠的急性经口毒性实验、小鼠骨髓微核实验及鼠伤寒沙门氏菌实验(Ames 实验),探索该种无溶剂饮水舱防腐涂料的毒性作用,为其安全性提供一定的科学依据。

本实验结果表明,该种无溶剂饮水舱防腐涂料急性毒性 $LD_{50} > 20000$ mg/(kg BW),属实际无毒物质。Ames 实验用于检测有害物质的体外致突变性,主要检测的遗传学终点为基因内的点突变和移码突变,具有快速、有效、经济的特点。本研究中,Ames 实验结果显示,受试物各剂量组在加与不加 S9 时回变菌落数均未见明显增加,与自发回变菌落数之比均小于 2,亦无剂量-反应关系,表明该种无溶剂饮水舱防腐涂料在 Ames 实验中未呈现致突变性。

表 1 骨髓细胞微核实验结果
Table 1 Results of bone marrow cells micronucleus test

性别	剂量/[mg/(kg BW)]	动物数/只	观察 PCE 数/个	微核数/个	微核率/%	PCE/RBC
雄	阴性对照	5	1000×5	8	1.6	0.86
	阳性对照	5	1000×5	79	15.8**	0.83
	5000	5	1000×5	9	1.8	0.90
	2500	5	1000×5	8	1.6	0.84
	1250	5	1000×5	9	1.8	0.89
雌	阴性对照	5	1000×5	7	1.4	0.85
	阳性对照	5	1000×5	87	17.4**	0.90
	5000	5	1000×5	12	2.4	0.97
	2500	5	1000×5	9	1.8	0.86
	1250	5	1000×5	7	1.4	0.85

注: 阳性对照组的微核率较高,与阴性对照组比较 ** $P < 0.01$ 。

表 2 Ames 实验结果(*n*=3)
Table 2 Results of Ames experimental (*n*=3)

组别	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
空白对照	98±10	156±24	35±3	37±16	146±12	174±10	267±9	297±15
溶剂对照	100±9	149±15	37±5	35±3	129±8	168±13	269±19	281±15
10 μL/皿	141±38	129±40	35±4	41±3	141±11	159±18	258±13	282±13
40 μL/皿	108±9	156±20	35±3	40±3	143±17	158±17	258±8	269±18
100 μL/皿	128±9	158±10	37±7	35±4	141±6	153±31	253±10	292±19
200 μL/皿	107±18	140±8	35±4	40±8	160±33	133±9	262±19	286±9
阳性对照	2637±96	1623±39	1189±98	6043±203	2989±122	2995±99	884±63	991±52

注: 阳性对照物: TA97、TA98、TA102 -S9 用敌克松 50 μg/皿; TA100 -S9 用叠氮钠 1.5 μg/皿; TA97、TA98、TA100 +S9 用 2-氨基苄 10 μg/皿; TA102 +S9 用 1,4-二羟基蒽醌 50 μg/皿。

骨髓细胞微核实验是一种用于检测体内染色体损伤突变和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的实验方法。骨髓细胞微核实验中, 3 个剂量组与阴性对照组比较差异均无统计学意义, 表明在本实验条件下, 未发现该种无溶剂饮水舱防腐涂料导致小鼠微核发生率增加。本次研究结果表明, 在本实验条件和剂量范围内, 该种无溶剂饮水舱防腐涂料实验结果符合卫生安全要求。

参考文献

[1] 赵金榜. 工业涂料使用要求及品种(二)[J]. 上海涂料, 1996, 34(3): 145-149.
ZHAO JB. Application requirements and varieties of industrial coatings (2) [J]. Shanghai Coat, 1996, 34(3): 145-149.

[2] 王天潇, 方倩, 郭常青, 等. 船舶饮水舱涂料的研究进展及应用[J]. 中国涂料, 2018, 33(5): 20-22.
WANG TX, FANG Q, GUO CQ, *et al.* Progress in research and application of ships' drinking water tank coatings [J]. China Coat, 2018, 33(5): 20-22.

[3] 张万波. 涂料在饮用水容器防腐工程中的应用[J]. 武汉造船, 2000, (1): 23-26.
ZHANG WB. Application of coating in anticorrosion engineering of drinking water container [J]. Wuhan Ship Build, 2000, (1): 23-26.

[4] 赖华生, 李铭源. 无毒环氧饮水舱涂料及其制备方法[J]. 现代涂料与涂装, 2016, 19(1): 28-29, 42.
LAI HS, LI MY. Non-toxic epoxy coating for drinking tank and its preparation method [J]. Mod Paint Finish, 2016, 19(1): 28-29, 42.

[5] 石勇, 方倩, 郭常青, 等. 环境友好型长寿命淡水舱涂料的制备及性能

研究[J]. 中国涂料, 2016, 31(10): 29-32.
SHI Y, FANG Q, GUO CQ, *et al.* Preparation of environmentally friendly ship fresh water tank coatings and study on its properties [J]. China Coat, 2016, 31(10): 29-32.

[6] 孙希鹏, 杜景怡, 王新征. 低温快干无溶剂环氧饮水舱涂料及制备方法: 中国, 201010616731.0 [P]. 2010-12-30.
SUN XP, DU JY, WANG XZ. Low temperature fast drying solvent-free epoxy water tank coating and its preparation method: China, 201010616731.0 [P]. 2010-12-30.

[7] 陈鸿毅. 环氧涂料将向无溶剂方向发展[N]. 中国船舶报, 2008-02-15(7).
CHEN HY. Epoxy coatings will develop to solvent-free direction [N]. China Shipbuilding News, 2008-02-15(7).

[8] 梁新方. 无溶剂环氧饮水舱涂料的制备[J]. 中国涂料, 2011, 26(6): 58-62.
LIANG XF. Preparation of solvent-free epoxy coatings for drinking tank [J]. China Coat, 2011, 26(6): 58-62.

[9] 方倩, 宋振伟, 张善贵, 等. 新型食品窗口内壁无毒涂料的研制及应用[J]. 中国涂料, 2011, 26(7): 35-42.
FANG Q, SONG ZW, ZHANG SG, *et al.* Preparation and use of new non-toxic coatings for food container interior wall [J]. China Coat, 2011, 26(7): 35-42.

[10] GB/T 5750—2001 生活饮用水卫生规范[S].
GB/T 5750—2001 Sanitary code for drinking water [S]

[11] OECD. Test No. 420: Acute Oral toxicity-fixed dose procedure. OECD guideline for testing of chemicals-Section 4: Health effects [S].

[12] 张娟, 陈岳林, 蒋晨, 等. 无溶剂环氧重防腐涂料的制备及性能测试

[J]. 广东化工, 2012, 39(8): 31–33.

ZHANG J, CHEN YL, JIANG C, *et al.* Preparation and performance test of solvent-free epoxy heavy-duty coating [J]. Guangdong Chem Ind, 2012, 39(8): 31–33.

- [13] 岳跃法, 方倩, 阮景阳, 等. 无溶剂环氧饮水管路防腐涂料的制备及性能研究[J]. 中国涂料, 2013, (4): 43–46.

YUE YF, FANG Q, RUAN JY, *et al.* Preparation and properties study of solvent-free epoxy anti-corrosion coatings applied in drinking water pipes [J]. China Coat, 2013, (4): 43–46.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



李 姿, 主管技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。

E-mail: 63248889@qq.com



刘 敏, 副主任技师, 主要研究方向为食品毒理学安全性评价。

E-mail: 108616255@qq.com