Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора – люминометра типа «Биотокс-10»)

Методические рекомендации
МР 1.1.0120—18

Издание официальное

Москва • 2018

gost.e-ecolog.ru

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора – люминометра типа «Биотокс-10»)

Методические рекомендации
МР 1.1.0120—18

ББК 52.84
Э41

Э41 **Экспресс**-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора – люминометра типа «Биотокс-10»): Методические рекомендации.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—12 с.

ISBN 978–5–7508–1635–4

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Роспотребнадзора.

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 13 февраля 2018 г.

3. МР 1.1.0120—18 введены взамен МР 1.1.0119—17 «Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора-люминометра типа «Биотокс-10»), утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 22.12.2017.

ББК 52.84

Редактор Л. С. Кучурова
Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 22.08.18

Формат 60x84/16 Печ. л. 0,75

Тираж 100 экз. Заказ 38

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2018

Содержание

I. Общие положения 4
II. Описание метода 5
III. Оборудование, химическая посуда и реактивы 6
IV. Проведение испытаний 7
V. Оценка результатов испытаний 12

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

А. Ю. Попова

13 февраля 2018 г.

1.1. ОБЩИЕ ВОПРОСЫ. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора – люминометра типа «Биотокс-10»)

Методические рекомендации МР 1.1.0120—18

I. Общие положения

1.1. Методические рекомендации содержат описание метода токсикологического тестирования парфюмерно-косметической (далее – ПК) продукции с применением в качестве тест-объекта (биосенсора) реактива люминесцентных бактерий «Эколюм» или иных препаратов бактериальной люциферазы и определяют порядок проведения испытаний следующих видов ПК-продукции (далее – методические рекомендации, метод):

– продукция косметическая гигиеническая моющая;

– жиросодержащие косметические средства;

– продукция косметическая жидкая, не содержащая спирт;

– гели косметические;

– продукция декоративной косметики на эмульсионной основе;

– продукция косметическая для окрашивания, осветления, химической завивки и выпрямления волос;

– продукция косметическая на носителях;

– пилинги, скрабы, эксфолианты;

– интимная косметика;

– парфюмерная и косметическая спиртосодержащая продукция;

– дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке и не в аэрозольной упаковке;

– продукция декоративной косметики порошкообразная и компактная, тальк, присыпки, зубные порошки;

– кремы косметические для ухода за кожей лица, тела, волосами, ногтями, губами, кожей вокруг глаз;

– продукция декоративной косметики на жировосковой основе;

– средства для маникюра и ухода за ногтями;

– мыло туалетное твердое;

– соли для ванн, сухие средства для ванн;

– зубные пасты;

– средства гигиены полости рта жидкие;

– средства для домашнего отбеливания зубов;

– косметическая продукция индивидуальной защиты кожи от воздействия вредных производственных факторов.

1.2. Методические рекомендации предназначены для оценки общетоксического действия вновь разрабатываемой и серийно выпускаемой ПК-продукции.

Метод может быть применен для скрининговой оценки ПК-продукции в качестве самостоятельного экспресс-метода или в сочетании с другими токсиколого-гигиеническими методами.

1.3. Методические рекомендации предназначены для учреждений научно-исследовательского и практического профиля, осуществляющих разработку новых видов ПК-продукции, контроль ее качества и оценки соответствия, а также для органов и организаций, осуществляющих федеральный государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

II. Описание метода

2.1. В качестве тест-объекта используются препараты «Эколюм» лиофилизированных люминесцентных бактерий или иные препараты бактериальной люциферазы. Метод основан на определении изменения интенсивности бактериальной биолюминесценции при воздействии химических веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем. Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

2.2. Критерием токсического действия является измерение с помощью прибора типа «Биотокс-10» интенсивности биолюминесценции тест-объекта под воздействием химических соединений, содержащихся в экстрактах ПК-продукции, по сравнению с раствором, не содержащим токсических веществ, или эталонной пробой. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

При изучении токсикологических свойств ПК-продукции и ее химических ингредиентов люминесцентный бактериальный тест показывает хорошую корреляцию с их действием на высших животных.

Токсическое действие исследуемой пробы определяется по ингибированию интенсивности ее биолюминесценции за 30-минутный (в экспрессном варианте – 5 мин) период экспозиции. Количественные оценки тест-реакции выражаются в виде безразмерной величины – индекса токсичности «*T*».

2.3. Индекс токсичности «*T*» равен отношению $T = 100 \times (I_o - I)/I_o$, где I_o и I – интенсивность биолюминесценции контроля и опыта соответственно при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с бактериальным препаратом.

Метод допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

1-й уровень: *допустимая степень токсичности образца* – индекс токсичности «*T*» меньше 20;

2-й уровень: *образец токсичен* – индекс токсичности «*T*» равен или больше 20 и меньше 50;

3-й уровень: *образец сильно токсичен* – индекс токсичности «*T*» равен или более 50.

Основанием для выбора эталонных разведений различных видов ПК-продукции с учетом допустимого интервала индекса токсичности послужила сравнительная оценка результатов исследования общей токсичности настоящим методом и кожно-раздражающего действия различных видов ПК-продукции в эксперименте на лабораторных животных.

III. Оборудование, химическая посуда и реактивы

3.1. Измерительный прибор – люминометр типа «Биотокс-10» с набором кювет на 1,5 мл.

3.2. Лиофилизированная культура микроорганизмов «Эколюм» или иных препаратов бактериальной люциферазы.

3.3. Весы лабораторные по ГОСТ OIML R 76-1—2011, высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

3.4. pH-метр любой марки с набором электродов.

3.5. Сушильный электрический шкаф, ГОСТ 13474.

3.6. Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от –18 до +4 °С.

3.7. Пробирки с притертыми пробками объемом 3—5 мл, ГОСТ 1770—74.

3.8. Дозаторы лабораторные по ГОСТ 28311. Цилиндры вместимостью 25, 50 мл, второго класса точности, ГОСТ 1770.

3.9. Воронки делительные на 100 мл типа ВД-1-100.

3.10. Фильтры бумажные «синяя лента» или обеззоленные типа ФОБ, ТУ 6-09-1678.

3.11. Стаканчики для взвешивания диаметром 30, 40 мм, ГОСТ 7148.

3.12. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709.

3.13. Кислота соляная, ГОСТ 3118.

3.14. Натрия гидроокись, ГОСТ 4328.

3.15. Цинк сернокислый 7-водный, ГОСТ 4174.

3.16. Спирт этиловый, хч, ТУ 6-091710.

3.17. Кислота серная, ГОСТ 4204.

3.18. Термометр, предметное стекло (технические характеристики).

Допускается применение аналогичного оборудования и материалов с техническими и метрологическими характеристиками, а также реактивов по качеству не ниже указанных в п. 3 методических рекомендаций.

При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

IV. Проведение испытаний

4.1. *Условия выполнения токсикологических испытаний*

При проведении испытаний в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

– температура воздуха	от 18 до 25 °С;
– относительная влажность воздуха	не более 80 %;
– атмосферное давление	84—106 кПа (630—800 мм рт. ст.);
– частота переменного тока	(50 ± 1) Гц;
– напряжение сети	(220 ± 10) В.

4.2. Отбор проб проводится по ГОСТ 29188.0—2014.

4.3. *Приготовление экстрактов из образцов ПК-продукции*

4.3.1. Из поступивших на испытания образцов одного наименования (не менее двух единиц) составляют объединенную пробу. Опытные образцы готовят путем разбавления испытуемых образцов в модельной среде (дистиллированная вода).

В сосуд помещают необходимое количество пробы ПК-продукции, заливают определенным объемом дистиллированной воды и выдерживают (настаивают) в термостате при температуре 37 °С определенное время (продолжительность экстракции).

Соотношение массы (объема) испытуемой продукции и объема модельной среды, а также продолжительность экстракции, приведены в табл. 1.

После окончания экстракции полученные экстракты охлаждают до комнатной температуры и отделяют водную фазу фильтрацией или с помощью делительной воронки.

Испытуемые образцы продукции на носителях предварительно измельчают ножницами.

Испытуемые образцы ПК-продукции, представляющей собой жиросодержащие средства, порошкообразные и компактные, эмульсии и суспензии, продукцию на носителях, требуют периодического перемешивания в течение времени экстракции.

По продукции, применение которой согласно аннотации подразумевает смешивание нескольких компонентов перед применением (для окрашивания, осветления, мелирования волос, для химической завивки или распрямления волос, сухие косметические маски и другая аналогичная продукция), испытуемые образцы готовят в зависимости от полученной консистенции готовой композиции.

Средства для ухода за ногтями требуют предварительной подготовки. На предметное стекло (2 × 2 см) ровным слоем наносят исследуемую навеску (1 г) образца и оставляют при комнатной температуре до полного высыхания. Высушенную пробу переносят в сосуд с дистиллированной водой и готовят экстракт в соответствии с п. 4.3.1.

Таблица 1

Условия приготовления водных экстрактов в зависимости от вида продукции

№ п/п	Вид ПК-продукции	Масса или объем образца	Объем дистиллированной воды, мл	Степень разведения	Продолжительность экстракции, мин
1	2	3	4	5	6
1	Продукция косметическая гигиеническая моющая	1 мл	20	1 : 20	10
2	Жиросодержащие косметические средства	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
3	Продукция косметическая жидкая, не содержащая спирт	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
4	Гели косметические	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
5	Продукция декоративной косметики на эмульсионной основе	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6
6	Продукция косметическая для окрашивания, осветления, химической завивки и выпрямления волос	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
7	Продукция косметическая на носителях	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
8	Пилинги, скрабы, эксфолианты	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
9	Интимная косметика	0,1 мл или 0,1 г	100	1 : 1 000	60
10	Парфюмерная и косметическая спиртосодержащая продукция	1 мл	20	1 : 20	10
11	Дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке	0,1 мл	100	1 : 1 000	10
12	Продукция декоративной косметики порошкообразная и компактная, тальк, присыпки, зубные порошки	0,1 г	100	1 : 1 000	10
13	Кремы косметические для ухода за кожей лица, тела, волосами, ногтями, губами, кожей вокруг глаз	1 г	10	1 : 10	60
14	Продукция декоративной косметики на жировосковой основе	1 г	10	1 : 10	60
15	Дезодоранты и депиляторы не в аэрозольной упаковке	1 г	10	1 : 10	60
16	Средства для маникюра и ухода за ногтями	1 г	20	1 : 20	60
17	Мыло туалетное твердое, соли для ванн, сухие средства для ванн	0,1 г	100	1 : 1 000	60
18	Зубные пасты	1 г	1 000	1 : 1 000	60
19	Средства гигиены полости рта жидкие	1,0 мл	1 000	1 : 1 000	10
20	Средства для домашнего отбеливания зубов	1 г	1 000	1 : 1 000	60

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

4.4. Подготовка прибора «Биотокс-10» и тест-объекта «Эколюм»

4.4.1. *Подготовка прибора «Биотокс-10»*

Подготовку прибора «Биотокс-10» проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

4.4.2. *Регидратация биосенсора «Эколюм»*

4.4.2.1. Вскрыть флакон с лиофилизированным препаратом «Эколюм».

4.4.2.2. Добавить 10 мл дистиллированной воды комнатной температуры для получения суспензии бактериального препарата. Рекомендуется использовать стерилизованную дистиллированную воду, а также несколько раз встряхнуть флакон с суспензией препарата.

Рекомендуется перемешивание рабочей суспензии препарата перед отбором определенных объемов для проведения анализа.

4.4.2.3. Выдержать суспензию в течение 30 мин.

4.4.3. *Определение рабочей концентрации биосенсора «Эколюм»*

4.4.3.1. Измерить фоновое значение прибора «Биотоке-10» (по инструкции к прибору, при счете 10 с без кюветы) и записать это значение.

4.5. Проведение измерений

4.5.1. Добавить 0,1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавить 0,9 мл дистиллированной воды (комнатная температура).

4.5.2. Вставить кювету с биосенсором в люминометр и измерить величину интенсивности биолюминесценции. Свечение рабочей суспензии бактерий должно находиться в интервале, превышающем фоновое значение прибора в 25—250 раз. Если величина больше интервала, то следует разбавить суспензию бактерий дистиллированной водой и повторить измерение.

Если биосенсер стал меньше растворяться в холодной дистиллированной воде, рекомендуется более энергично его встряхивать и отфильтровать суспензию бактерий через бумажный фильтр.

4.5.3. В стандартном анализе приготовляют контрольный образец путем смешения в кювете от люминометра 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды. При приготовлении опытных образцов к 0,1 мл рабочей суспензии бактерий добавляют 0,9 мл пробы ПК-продукции различного разведения в соответствии с табл. 1 методических рекомендаций. Температура дистиллированной воды и образцов должна быть одинаковой. Указать значение температуры.

Измерение токсикологических параметров проводят с помощью прибора «Биотокс-10» в стандартном варианте через 30 мин экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 мин.

4.5.4. Контроль погрешности метода токсикологического анализа.

Контроль качества оценки токсичности объектов окружающей среды проводится по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту цинку сернокислому 7-водному ($ZnSO_4 \times 7H_2O$). Расчет проводится по содержанию ионов цинка. Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 30 мин интенсивность биолюминесценции ингибируется на 50 %, составляет 0,6—1,5 мг/л.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования люминесцентных бактерий на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, нарушения, допускаемые в условиях проведения опытов.

Процедура определения диапазона реагирования тест-системы «Эколюм» на модельный токсикант проводится путем действия раствора, содержащего 4,4 мг/л цинка сернокислого, при времени инкубации 30 мин с биосенсором. Должно происходить не менее чем 50 % ингибирование интенсивности биолюминесценции по сравнению с контролем. В случае если эта величина меньше, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов, условий проведения опытов.

4.6. Математическая обработка результатов измерений

4.6.1. Результат токсикологического анализа – индекс токсичности – в документах, предусматривающих его использование, представляется в виде:

$$\bar{x} \pm s \text{ при } P = 0{,}95, \text{ где}$$

$\bar{x}$ – среднее арифметическое определений, s – среднеквадратичное отклонение, P – уровень вероятности.

За результат анализа ($\bar{x}$) принимают среднее арифметическое результатов трех (или более – до 10) параллельных измерений индекса токсичности. Индекс токсичности «T» вычисляется по формуле: $T = 100 \cdot (I_{контр} - I_{опыт})/I_{контр}$, где $I_{контр}$ и $I_{опыт}$ – интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольной и опытной пробах соответственно.

Среднее квадратичное отклонение (σ) результатов определений количественного выражения тест-реакции – индекса токсичности – вычисляется по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}, \text{ где}$$

x_i – i-й результат определений;

n – число параллельных определений.

Среднее арифметическое $\bar{x}$ результатов определений количественного выражения тест-реакций вычисляется по формуле:

$$\bar{x} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

Все указанные статистические параметры вычисляются измерительным прибором «Биотокс-10» автоматически по команде оператора.

V. Оценка результатов испытаний

5.1. Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «*T*».

В ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения «*T*» делается вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

По величине индекса токсичности анализируемые пробы классифицируются на три группы в соответствии с табл. 2.

Таблица 2

Классификация токсичности проб

Группы	Индекс токсичности «Т»	Вывод о степени токсичности пробы
1	меньше 20	допустимая степень токсичности
2	от 20 до 50	образец токсичен
3	равен или больше 50	образец сильно токсичен

Если при оценке токсичности продукции по величине индекса токсичности получено значение индекса токсичности более 20, то вывод о токсикологической безопасности продукции должен быть сделан после испытаний продукции аналогичными альтернативными методами или методами *in vivo*.

gost.e-ecolog.ru