Государственная система санитарно-эпидемиологического

нормирования Российской Федерации

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО И КОЖНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ IN VITRO (НА КУЛЬТУРЕ ПОДВИЖНЫХ КЛЕТОК)

Методические рекомендации

Минздрав России

МОСКВА

2001 г.

gost.e-ecolog.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель главного

государственного санитарного

врача Российской Федерации

Е.Н.Беляев

№ 2900/394

от 29.01.2002

1.2. Гигиена, токсикология, санитария

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО И КОЖНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ IN VITRO (НА КУЛЬТУРЕ ПОДВИЖНЫХ КЛЕТОК).

Методические рекомендации

Разработаны НИИ медицины труда РАМН (Измерова Н.И., Мигукина Н.В., Мальцева Н.М., Петрова Л.П., Котова Л.Г.), Всероссийским научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники Минздрава РФ (Еськов А.П.), Акционерным обществом «БМК-Инвест» (Каюмов Р.И.), Центром госсанэпиднадзора в г.Москве (Завьялов Н.В.).

Методические рекомендации одобрены Лабораторным советом Госсанэпидслужбы России (протокол № 1 от 22.01.2002г.)

Содержание

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

2. ОПИСАНИЕ МЕТОДА

3. ОБОРУДОВАНИЕ, ХИМИЧЕСКАЯ ПОСУДА И РЕАКТИВЫ

4. ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ

5. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИСПЫТАНИЙ

1.Область применения

Методические рекомендации содержат описание метода тестирования парфюмерно-косметической (ПК) продукции с применением кратковременной суспензионной культуры подвижных клеток (сперматозоидов быка) и определяют порядок проведения испытаний следующих видов ПК продукции: жидкие моющие средства, дезодоранты и депилятории в аэрозольной упаковке, туалетная и парфюмированная вода, духи, одеколон, спиртосодержащие лосьоны

Методические рекомендации предназначены для скрининговой оценки вновь разрабатываемой и серийно выпускаемой ПК продукции с учетом общетоксического и кожно-раздражающего действия.

Методика может быть применена в качестве самостоятельного экспресс-метода или в сочетании с другими токсиколого-гигиеническими методами.

Методические рекомендации предназначены для учреждений научно-исследовательского и практического профиля, осуществляющих разработку новых видов ПК продукции и контроль ее качества.

2.Описание метода.

В качестве тест-объекта используется сперма крупного рогатого скота, замороженная в парах жидкого азота. Гранулы замороженной бычьей спермы получают на станциях искусственного осеменения и хранят в сосудах Дьюара, наполненных жидким азотом.

Критерием токсического действия является изменение двигательной активности сперматозоидов под воздействием химических соединений, содержащихся в экстрактах ПК продукции, по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащей токсических веществ. Изменение двигательной активности измеряется показателем подвижности «m» и регистрируется автомати-

чески анализатором токсичности по изменению интенсивности светового потока при движении сперматозоидов через оптический зонд.

$$m = d \cdot Cn \cdot \overline{V},$$

где d - постоянный коэффициент,

Cn - концентрация подвижных клеток,

$\overline{V}$ - средний модуль скорости клеток.

Количественная оценка параметра тест-реакции выражается индексом токсичности «I_t», представляющего собой отношение суммарной двигательной активности сперматозоидов опытной и контрольной проб, выраженное в процентах. Величина индекса токсичности, гарантирующая безопасность ПК изделий, находится в интервале от 70 до 120%. Сравнительная оценка результатов исследования общей токсичности и кожно-раздражающего действия ПК изделий в эксперименте на лабораторных животных и их различных разведений на культуре сперматозоидов послужила основанием для выбора эталонных разведений перечисленных ранее групп ПК изделиі с учетом допустимого интервала индекса токсичности.

3.Оборудование, химическая посуда и реактивы

3.1. Анализатор токсичности АТ-4.

3.2. Сосуд Дьюара типа СДС, объемом не менее 25 л и диаметром горла не менее 50 мм.

3.3.Термостат типа ТС-80М-2 (25-80^{0}С).

3.4.Весы аналитические с погрешностью взвешивания не более 1мг, ГОСТ 24104-88.

3.5. Пробирки с притертыми пробками объемом 3-5 мл - 10 шт., ГОСТ 1770-74,

3.6. Дозаторы пипеточные на объемы 0,5 мл, 0,2 мл и 0,1 мл, ТУ 2Т2.993.053,

3.7. Мерные колбы с притертыми пробками объемом 50 мл - 2 шт., ГОСТ 1770-74.

3.6.Пинцет анатомический длиной 250 мм.

3.7.Глюкоза ч., ГОСТ 6038-74.

3.8. Цитрат натрия трехзамещенный ч., ГОСТ 22280 -76.

3.9. Сперма быка, замороженная в жидком азоте, ГОСТ 26030-83.

3.10.Фильтры АФА-ВП-10. ТУ 95-743-80.

4.Проведение испытаний

4.1.Приготовление экстрактов из образцов ПК продукции.

4.1.1. Экстракты из испытуемых образцов готовят путем настаивания в дистиллированной воде. Соотношения веса образца и объема модельной среды (дистиллированной воды), а также продолжительность экстракции приведены в таблице 1. Навески ПК продукции взвешивают в сухой чистой колбе, куда затем добавляют требуемый объем модельной среды. В другую колбу наливают модельную среду и обе колбы помещают в термостат на 24 часа при температуре +37^{0}С. После окончания экстракции растворы охлаждают до комнатной температуры.

Таблица 1

Условия приготовления экстрактов

Вид ПК продукции	Масса образца, г	Объем модельной среды, мл	Степень разведения образца	Продолжительность экстракции, час
Шампуни для волос и тела	0,1	250	1:2500	24
Жидкое туалетное мыло	0,1	250	1:2500	24
Пена для ванн, гель для душа	0,1	250	1:2500	24
Дезодоранты и депилятории в аэрозольной упаковке	1,0	300	1:300	1
Туалетная и парфюмированная вода, духи, одеколон, спиртосодержащие лосьоны.	1,0	700	1:700	1

4.1.2. После завершения экстракции экстракт подвергают фильтрации через бумажный фильтр с целью удаления взвешенных частиц. Фильтрованию подвергают также и модельную среду.

4.1.3. В качестве фильтра используют бумажный фильтр АФА-ВП-10 диаметром 9 см. Бумажные фильтры должны быть заранее промыты и просушены. Для этого предварительно до эксперимента 10 бумажных фильтров опускают в большой стакан, заполненный 1,5 дистиллированной воды. Стакан накрывают стеклянной пластинкой и ставят в термостат на 24 часа при температуре +37 С. Затем дистиллированную воду выливают, а стакан с мокрыми фильтрами ставят обратно в термостат с целью высушивания фильтров до постоянной массы. Достижени постоянной массы контролируют взвешиванием каждого фильтра на аналитических весах.

4.1.4.После фильтрования из модельной среды и экстрактов готовят изотонические растворы добавляя в них сухие реактивы глюкозы и цитрата натрия (глюкоза – 4г, цитрат натрия – 1 фильтрат– 100мл).

4.2. Проведение измерений.

Для определения индекса токсичности изотонического фильтрата экстракта, далее опытного раствора, необходимо сравнить его с изотоническим фильтратом модельной среды,.

4.2.1.Контрольный и опытный изотонические экстракты не менее, чем за час до начала эксперимента по 0,4 мл помещают в пробирки с притертыми пробками и ставят в водяную баню при температуре (40±1,5)°С.

4.2.2. Приготовление раствора спермы. Оттаивают замороженную сперму в разбавителе. Состав разбавителя: глюкоза - 4 г, цитрат натрия - 1 г, дистиллированная вода - 100 мл. В чисту сухую пробирку наливают 0,4 мл разбавителя и ставят в водный термостат при температур (40±1,5)°С. Охлажденным до температуры жидкого азота анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и быстро опускают в нагретый раствор.

4.2.3. Приготовление тест-системы. В каждую пробирку с модельной средой и опытным экстрактом из ПК изделия приливают по 0,1 мл раствора спермы. Полученную смесь экстрактов спермы из каждой пробирки переносят в капилляры (минимум по 5 на один образец) и устанавливают в каретку прибора. Проводят измерения согласно инструкции к прибору.

4.3.Математическая обработка результатов измерений.

Обработку экспериментальных данных осуществляют вручную или с помощью компьютера по прилагаемой к анализатору токсичности программе

Для каждого образца вычисляют суммарную двигательную активность S:

$$S = \sum_i m_i ,$$

где m_i - значение показателя подвижности

Для контрольной и опытной выборок образцов вычисляют среднее арифметическое значение среднеквадратичное отклонение, по которым в свою очередь вычисляют для каждой выборки коэффициент вариации С:

$$C = \frac{\delta}{\bar{x}} \cdot 100\% ,$$

где δ - среднеквадратичное отклонение,

$\bar{x}$ - среднее арифметическое значение.

В случае получения значения коэффициента вариации более 15% хотя бы для одной из выборок, эксперимент повторяют, начиная с 4.1. Если значения коэффициентов вариации для каждой из выборок меньше или равно 15%, то результаты считают пригодными для статистической обработки. Затем вычисляют величину индекса токсичности I_t^x:

$$I_t^x = \frac{S_{cp}^{опыт}}{S_{cp}^{контр}} \cdot 100\%$$

где $S_{cp}^{опыт}$ и $S_{cp}^{контр}$ - величины суммарной двигательной активности сперматозоидов, усредненные по нескольким соответственно опытным и контрольным образцам.

5.Оценка результатов испытаний

Оценка результатов испытаний осуществляется путем сравнения полученных значений индексов токсичности для исследованных образцов и допустимого интервала индекса токсичности. Индекс токсичности от 70% до 120% указывает на то, что испытуемый образец относится к 4

классу малоопасных соединений согласно классификации ГОСТ 12.1.007-76, и не обладает кожно-раздражающим действием при соблюдении условий применения согласно этикетке. Образец направляется на проведение клинических испытаний на людях-добровольцах.

Во всех остальных случаях результаты свидетельствуют о несоответствии требованиям безопасности, предъявляемым к ПК-продукции. В этой ситуации испытанный образец может быть подвергнут расширенным санитарно-химическим и токсикологическим исследованиям.

gost.e-ecolog.ru