ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ЛАБОРАТОРНЫЙ СОВЕТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ТЕСТА

Методические рекомендации

№ 01.038—08

Москва • 2008

gost.e-ecolog.ru

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста

Методические рекомендации

№ 01.038—08

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста· Методические рекомендации - М «Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», 2008 - 17 с

Методические рекомендации разработаны ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Завьялов Н В., Клочкова С И, Скворцова Е.Л), МГУ им М В Ломоносова (Данилов В С , Юдина Т П)

Содержание

1	Область применения	4
2	Нормативные ссылки	5
3	Термины и определения	5
4	Принцип методики	6
5	Количественная оценка параметров тест-реакции	6
6	Оборудование, химическая посуда и реактивы	7
7	Характеристика тест-объекта «Эколюм» и прибора «Биотокс-10»	8
8	Условия безопасного проведения работ	
9	Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование	8
10	Условия выполнения измерений	8
11	Подготовка к проведению измерений	9
12	Проведение испытаний	11
13	Обработка, оценка и оформление результатов	12
14	Контроль погрешности методики токсикологического анализа	14
15	Форма представления результатов анализа	14
	Приложение 1 (рекомендуемое)	15

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Председатель Лабораторного Совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека



А.И. Верещагин
«20» ноября 2008 г.

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста

МР № 01.038—08

1. Область применения.

Методические рекомендации содержат описание метода токсикологического тестирования парфюмерно-косметической (ПК) продукции с применением в качестве тест-объекта реактива люминесцентных бактерий «Эколюм» и определяют порядок проведения испытаний следующих видов ПК продукции жидкие пеномоющие средства (пена для ванн, гель для душа, жидкое туалетное мыло), шампуни для волос и тела; дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке, парфюмерные жидкости (туалетная и парфюмерная вода, духи, одеколон, лосьоны после бритья и пр), водно-спиртовые, пропиленгликолевые экстракты, ароматические экстракты, масляные экстракты, жиросодержащие косметические средства (лосьоны, косметические эмульсии, косметическое молочко), кремы косметические, лаки маникюрные и средства для ухода за ногтями

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

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

Методические рекомендации предназначены для учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ, учреждений научно-исследовательского и практического профиля, осуществляющих разработку новых видов ПК продукции и контроль ее качества

Результаты исследования качества ПК продукции учитывают при определении уровня их возможного прямого или косвенного влияния на здоровье человека

2. Нормативные ссылки.

1 Закон РСФСР «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 19 апреля 1991 г

2 «Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 5 июня 1994 г № 625

3 Руководство Р 1 1 001-96 «Общие требования к построению, изложению и оформлению нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования»

4 Руководство Р 1 1 003-96 «Общие требования к организации разработки нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования»

5 ГОСТ Р 1 5-92 «Государственная система стандартизации Российской Федерации Общие требования построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов»

6 СанПиН 1 2 681-97 «Гигиенические требования к производству и безопасности парфюмерно-косметической продукции

7 МУ 05 РЦ/3140 «Методические указания по проведению токсикологических исследований ингредиентов косметических средств в эксперименте на животных» 8 8 МР 11-1/131-09 «Определение токсичности химических соединений, полимеров, материалов и изделий с помощью люминесцентного бактериального теста»

3. Термины и определения

Экотоксикологический государственный контроль осуществляется с целью регулярного слежения за соблюдением нормативов качества окружающей среды и предупреждения попадания токсических веществ в водные объекты

Химическое загрязнение воды - изменение химического состава воды, возникшее под прямым или косвенным воздействием производственной деятельности и вызывающее снижение ее качества, и возможную опасность для здоровья населения

Токсичность - степень проявления ядовитого действия разнообразных химических соединений и их смесей Токсичность - один из важных факторов, определяющих качество воды, достаточно информативный, существенно дополняющий наше представление о степени опасности или безопасности воды при ее использовании, являющийся необходимой составной частью комплексной системы контроля при стандартном анализе воды

Критерий токсичности (индекс токсичности) - достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности воды Среди тест-параметров наиболее часто используются выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной и метаболической активности организмов

Тест-реакция - это изменение какого-либо биохимического, морфологического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсиканта или их смесей

Биотестирование - проведение анализов по определению токсичности с помощью живых организмов Результаты оперативно сигнализируют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятельность организмов, причем не по отдельным компонентам, а по их смесям, часто неизвестной природы и не выявляемых другими методами анализа токсических веществ

Токсические эффекты, регистрируемые методами биотестирования, включают комплексный, синергический, антагонистический и дополнительные воздействия всех химических, физических и биологических компонентов, присутствующих в исследуемой воде, неблагоприятно влияющие на физиологические, биохимические и генетические функции тест-организмов

Биолюминесценция - интенсивное свечение в видимой области спектра, отражающее специфическую ферментативную функцию и общую метаболическую активность организмов

4. Принцип методики.

В качестве тест-объекта используются препараты «Эколюм» лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные препараты бактериальной люциферазы Методика основана 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 гем, 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

Критерием токсического действия является измерение с помощью прибора «Биотокс-10» интенсивности биолюминесценции тест-объекта под воздействием химических соединений, содержащихся в экстрактах ПК продукции по сравнению с раствором, не содержащей 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 высшие животные, метод Драйзе, культуры клеток человека, подкожной адсорбции, фототоксичности и т п

5. Количественная оценка параметров тест-реакции.

Токсическое действие исследуемой пробы определяется по ингибированию интенсивности ее биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции Количественные оценки тест-реакции выражаются в виде безразмерной величины - индекса токсичности «Т» и функциональными токсикологическими параметрами EC20 и EC50

Индекс токсичности «Т», равный отношению $T=100(Io-I)/Io$, где Io и I соответственно интенсивность биолюминесценции контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с бактериальным препаратом

Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности

1) допустимая степень токсичности образца индекс токсичности Т меньше 20,
2) 2) образец токсичен индекс Т равен или больше 20 и меньше 50,
3) образец сильно токсичен индекс токсичности Т равен или более 50

Токсикологические параметры пробы EC20 и EC50, определяемые также посредством измерения Io и I, позволяют быстро и экономно выяснить вопрос при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (EC20 и/или EC50) или при каких разведениях сильно токсический образец станет безопасным (величины менее EC20)

EC50 есть эффективный объем образца (в опытах с чистым химическим соединением - концентрация), вызывающий тушение свечение биосенсора на 50% по сравнению с контролем В этом случае образец сильно токсичен (индекс токсичности равен 50) EC20 есть эффективный объем образца, (в опытах с чистым химическим соединением - концентрация) который приводит к 20%-ному тушению свечения биосенсора по сравнению с контролем. В этом случае образец токсичен (индекс токсичности равен 20) Все значения величин менее EC20 свидетельствуют о том, что образец безвреден для человека

Вычисление величин EC проводят с использованием гамма-функции Гамма-функция (G) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой G=(Io-I)/I, где Io и I соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте Функция G очень удобна для точного определения величин EC20 и EC50 путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец высоко токсичен График G-функции в логарифмических координатах как функция изменения объема пробы (или концентрации отдельного вещества) есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти токсиканты в тест-объекте Люминометр «Биотокс-10» позволяет представлять величины G для каждой пробы, а также автоматически вычисляет величины EC20 и EC50

Количественным параметром токсичности ПК продукции является степень разбавления образца по отношению к исходному продукту, приводящая к величине параметров EC20 (токсичности) и EC50 (острой токсичности) Количественным параметром оценки качества ПК продукции по сравнению с эталоном этой продукции, оценки ингредиентов ПК продукции и оценки фототоксичности ПК продукции служит индекс токсичности

6. Оборудование, химическая посуда и реактивы.

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

Лиофилизированная культура микроорганизмов «Эколюм» или ферментные препараты бактериальной люциферазы, ТУ 2639-236-00209792-01

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

pH- метр, ГОСТ 25 7416 071 или аналоги

Сушильный электрический шкаф, ГОСТ 13474 Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от –18 до 4°С

Пробирки с притертыми пробками объемом 3-5 мл, ГОСТ 1770-74

Дозаторы пипеточные на объемы 1,0-0,1 мл

Цилиндры вместимостью 25, 50 мл, второго класса точности, ГОСТ 1770

Воронки делительные на 100 мл, типа ВД-1-100

Фильтры АФА-ВП-10, ТУ 95-743-80 или обеззоленные типа ФОБ, ТУ 6-09-1678

Стаканчики для взвешивания диаметром 30, 40 мм, ГОСТ 7148

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709

Кислота соляная, ГОСТ 3118

Натрия гидроокись, ГОСТ 4328

Цинк сернокислый 7-водный, ГОСТ 4174

Спирт этиловый, х ч , ТУ 6-091710

Кислота серная, ГОСТ 4204

7. Характеристика тест-объекта «Эколюм» и прибора «Биотокс-10».

Биосенсор «Эколюм» представляет собой лиофилизированные люминесцентные бактерии или бесклеточные препараты, содержащие бактериальную люциферазу Производится в соответствии с требованиями ТУ 2639-236-00209792-01 Биосенсор

находится в стеклянных флаконах в среде инертных газов При температуре 2-4°С и ниже имеет гарантированный срок хранения не менее 1 года

Специализированный люминометр «Биотокс-10» является измерительным прибором, предназначенным для проведения токсиколого-гигиенического мониторинга объектов окружающей среды, с использованием микробных биолюминесцентных сенсоров серии «Эколюм» Сочетание биохимического датчика с современной электронной аппаратурой позволяет обнаруживать с высокой достоверностью чрезвычайно малые количества токсических соединений и их смесей В приборе используется простая и надежная технология отбора и предъявления проб, которая безопасна при проведении экологической экспертизы в лабораторных условиях

Портативный прибор «Биотокс-10» может осуществлять следующие функции в автоматическом режиме определение интенсивности биолюминесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы, усредненной величины индекса токсичности, вычисление стандартного отклонения показателя токсичности, определения величин EC20 и EC50 - пороговых значений допустимой степени и острой степени токсичности образца, исследование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерная обработка данных, наличие сигнала для оператора при превышении пробой допустимого уровня токсичности

8. Условия безопасного проведения работ.

При работе с химическими веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12 4 021

Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте В конце дня проводится влажная уборка рабочих поверхностей.

Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12 1 019 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12 1 004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12 4 009

Используемые в качестве биотестов лиофилизированные бактерии не патогенны, однако после каждого анализа необходимо стерилизовать всю использованную посуду, остатки растворов в сушильном шкафу при 105°С в течение 1 часа

Хранить тест-культуру «Эколюм» в холодильнике при температуре от -18°С до +4°С, следует беречь культуру лиофилизированных бактерий от нагревания и резкой смены температуры

9. Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование.

Определение токсичности по настоящей методике выполняется оператором с квалификацией лаборант, имеющий опыт работы в области токсикологии

10. Условия выполнения измерений.

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150 Помещение не должно содержать токсичных паров и газов

Температура окружающего воздуха в лаборатории от + 18 до 25°С Относительная влажность воздуха 80 ± 5% Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм рт ст) При использовании электроприборов частота переменного тока 50 ± 1 Гц Напряжение сети 220 ± 10 В

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями

11. Подготовка к проведению измерений.

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки проб и исследования их на токсичность Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемый образец

11.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Обычно используется посуда из стекла Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью) Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2-3 час посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3-4 раза дистиллированной водой Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, - в сушильном шкафу при 105°С в течение 1 часа

Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающими крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т п

11.2. Подготовка проб. Извлечение водорастворимых форм химических соединений из ПК продукции.

Извлечение водорастворимых форм химических соединений из ПК продукции Экстракты из образцов готовят путем настаивания в дистиллированной воде Соотношение веса или объема образца и объема воды, а также продолжительность экстракции приведены в таблице 1 В сосуд помещают объем жидкого образца (или навеску порошкового образца), заливают определенным объемом дистиллированной воды (комнатная температура, pH 7 0-7 4) и выдерживают определенное время

ПК продукция, представленная маслосодержащие средствами и кремами, требует периодического перемешивания в течение времени экстракции В данных случаях после 1 часа экстракции осторожно отбирают водную фазу Водную экстракцию из жиросодержащих косметических средств удобно проводить в воронках делительных, поскольку сливается нижняя водная фаза

Средства для ухода за ногтями требуют предварительной подготовки На предметное стекло (2см х 2см) ровным слоем наносят исследуемую навеску (1г) образца и оставляют при комнатной температуре до полного высыхания Подсушенный образец средства для ногтей помещают в сосуд с дистиллированной водой (комнатная температура, pH 7.0-7.4). Объем воды и время экстракции приведены в таблице 1

После приготовления водных экстрактов из ПК продукции проводят их дополнительное разведение дистиллированной водой, получая по 4 пробы при следующих отношениях экстракт вода 1 1 (первичное разведение, приведено в таблице 1), 1 2, 1 4 и 1 8. Эта операция необходима для вычисления параметров ЕС,

Например, отбирают в пробирку с пробкой 5 мл первичного разведения шампуня (разведение 1 1), добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают Получают пробу с разбавлением 1 2 Затем в другую пробирку отбирают 5 мл этого экстракта и добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают Получают пробу с разбавлением 1 4 Потом в другую пробирку отбирают 5 мл этого экстракта и добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают Получают пробу с разбавлением 1 8

Таблица 1

Условия приготовления водных экстрактов в зависимости от вида продукции

Вид ПК продукции	Масса или объем образца	Объем дистиллиро-ванной воды, мл	Первичная степень разведения	Продолжи-тельность экстракции
Жидкие пеномоющие средства (пена для ванн, гель для душа, жидкое туалетное мыло), шампуни для волос и тела	1 мл	20	1 20	10 мин
Жиросодержащие косметические средства (лосьоны, косметические эмульсии, косметическое молочко), ароматические экстракты, масляные экстракты	0,1 мл или 0,1 г	100	1 1000	1 час
Спиртосодержащая продукция (лосьоны, одеколоны, духи, туалетная и парфюмерная вода)	1 мл	20	1 20	10 мин
Дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке	0,1 мл	100	1 1000	10 мин
Кремы косметические	1 г	10	1 10	1 час
Средства для ухода за ногтями(лаки, базы и основы под лак, укрепители и пр)	1 г	20	1 20	1 час

При исследовании отдельных ингредиентов ПК продукции необходимо сделать 4 последовательных разведения дистиллированной водой, получая по 4 пробы при следующих отношениях экстракт вода 1 1, 1 2, 1 4 и 1 8 Эта операция необходима для вычисления параметров ЕС

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность

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

Подготовка прибора «Биотокс-10».

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

Регидротация биосенсора «Эколюм».

Вскрыть флакон с лиофилизированным препаратом «Эколюм» Добавить 10 мл дистиллированной воды, pH 7 0-7 4 комнатной температуры для получения суспензии бактериального препарата Желательно использовать стерилизованную дистиллированную воду Рекомендуется несколько раз встряхнуть флакон с суспензией препарата

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

Выдержать суспензию в течение 30 минут

Определение рабочей концентрации биосенсора «Эколюм».

Измерить фоновое значение прибора «Биотокс-10» (по инструкции к прибору, при счете 10 сек без кюветы) и записать это значение

Добавить 0 1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра Затем туда же *добавить 0 9 мл дистиллированной воды* (pH 7 0-7 4, *комнатная температура*)

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

Если у биосенсора истек гарантийный срок хранения и/или он стал плохо растворяться *в холодной дистиллированной воде, рекомендуется более энергично его встряхивать* и отфильтровать суспензию бактерий через бумажный фильтр

12 Проведение испытаний.

В стандартном анализе приготовляют контрольный образец путем смешения в кювете от люминометра 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды (pH 7,0-7,4). При приготовлении опытных образцов к 0,1 мл рабочей суспензии бактерий добавляют 0 9 мл пробы ПК продукции различного разведения Температура дистиллированной воды и образцов должна быть одинаковой

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

12.1. ПК продукция. Ингредиенты ПК продукции.

При исследовании ПК продукции после вывода прибора в режим измерения ЕС определяется интенсивность свечения контрольной кюветы и 4-х проб, полученных путем разбавления исследуемой пробы дистиллированной водой в следующих отношениях 1 1, 1 2, 1.4 и 1 8. Для всех 4-х проб автоматически определяется G-функция, значения которой заносятся в оперативную память микроконтроллера прибора По данным этих измерений микроконтроллер при нажатии специальной кнопки клавиатуры управления производит автоматически вычисление коэффициентов ЕС20 и ЕС50 и представляет данные на дисплее

При исследовании коэффициентов ЕС ингредиентов ПК продукции рекомендуется убедиться при измерении токсичности приготовленного раствора, что величина G для данной пробы не превышает значения 25 В случае если величина больше, может увеличиться погрешность измерения величин ЕС В таком случае необходимо развести пробу дистиллированной водой

Как при исследовании ПК продукции, так и ингредиентов, после определения, путем измерения величины ЕС20 - насколько надо разбавить раствор, чтобы он стал не токсичным, необходимо учесть вклад этапа предварительного разбавления

Следует обратить внимание, что при интенсивности биолюминесценции опыта больше или равным контроля вычисление G-функции не производится В этом диапазоне образец не токсичен Следует уменьшить степень первичного разбавления.

Для большей достоверности проведения измерений рекомендуется делать несколько параллельных разбавлений исходного образца

12.2 Определение соответствие качества ПК продукции по сравнению с эталонным образцом.

В случае наличия эталонного образца ПК продукции исследования качества продукции проводятся по сравнению опытного и эталонного образцов Водная экстракция из эталонного образца проводится, как указано выше, и этот раствор используется как контроль Условия экстракции должны быть строго одинаковыми в контроле и опыте

Измеряется свечение эталонной пробы и прибор запоминает эту величину Затем измеряются повторности опытной пробы, и прибор автоматически фиксирует значения индекса токсичности каждой пробы и усредненную величину индекса токсичности В этом анализе параметры ЕС не измеряются

Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «Т» Абсолютная величина интенсивности биолюминесценции контроля не имеет принципиального значения в диапазоне допустимых значений прибора «Биотокс-10»

Рекомендуется измерять три повторности водного экстракта ингредиента Обработку результатов измерений токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности «Т» по формуле Т=(Т1+Т2+Т3)/3, где Т1-Т3 - повторности опытной пробы Величины Т1, Т2 и Т3 получают при измерении последовательности контроль, и затем серия опытных образцов

Прибор «Биотокс-10» автоматически определяет усредненный показатель индекса токсичности и погрешность измерения Если погрешность измерения большая, необходимо увеличить число повторностей

В случае определения токсичности пробы при малых разведениях можно определить насколько это связано со значениями pH исследуемого раствора Для этого измеряют pH пробы и, если величина pH находится за пределами 6 5-8 0, приводят pH до значений 7 0-7 4 и повторяют измерение токсичности

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

12.3. Определение фототоксичности ПК продукции.

При исследовании фототоксичности ПК продукции образцы предварительно подвергают освещению светом с длиной волны 300-750 нм и мощностью 5 дж/см^2 в течение 60 мин

Дальнейшие приготовления водных экстрактов и измерение токсичности образцов проводят, как описано выше (п 10 2) В качестве контроля используют водный экстракт из необлученной ПК продукции

13. Обработка, оценка и оформление результатов.

Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «Т» и параметров ЕС20 и ЕС50

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

По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на три группы (Таблица 2)

Таблица 2.

Группы	Величина индекса токсичности «Т»	Вывод о степени токсичности Пробы
1	меньше 20	допустимая степень токсичности
2	от 20 до 50	образец токсичен
3	равно или больше 50	образец сильно токсичен

Количественные оценки токсичности ПК продукции (параметр EC20), ингредиентов и фоточувствительности ПК продукции (индекс токсичности) представлены в таблице 3

Таблица 3

Количественные параметры оценки токсичности ПК продукции

Вид продукции	Т	EC20
Жидкие пеномоющие средства (пена для ванн, гель для душа, жидкое туалетное мыло), шампуни для волос и тела		1 100
Спиртосодержащая продукция (лосьоны, одеколоны, духи, туалетная и парфюмерная вода)		1 100
Жиросодержащие косметические средства (лосьоны, косметические эмульсии, косметическое молочко), ароматические экстракты, масляные экстракты		1 4000
Дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке		1 8000
Кремы косметические		1 100
Средства для ухода за ногтями(лаки, базы и основы под лак, укрепители и пр)		1 100
Ингредиенты ПК продукции	20	Концентрация, вызывающая EC20
Сравнение ПК продукции и ингредиентов с эталонным образцом	20	
Фототоксичность ПК продуктов	20	

ПК продукция признается токсичной, если согласно параметру EC20 необходимо большее разбавление, нежели указано в таблице 3 При достижении параметра EC50 продукция признается сильно токсичной

При определении токсичности ингредиента ПК продукции нужно сопоставить концентрацию, вызывающую EC20, с концентрацией этого ингредиента в ПК изделии Если она больше, то необходимы дополнительные анализы с применением других методов для заключения о возможности использования ингредиента

В случае выявления дополнительной токсичности ПК продуктов после освещения необходимы дополнительные анализы с применением других методов

При обнаружении отличия ПК продукции и ингредиентов от эталонных образцов на величину большую Т=20 следует провести дополнительные исследования качества продукции другими методами

Результат токсикологического анализа представляется в виде протокола (Приложение 1)

14. Контроль погрешности методики токсикологического анализа.

Контроль качества оценки токсичности объектов окружающей среды проводится по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту цинку сернокислому 7-водного ($ZnSO_4\,7H_2O$) Расчет проводится по содержанию ионов цинка Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 30 минут 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 минут с биосенсором Должно происходить не менее чем 50%-ное ингибирование интенсивности биолюминесценции по сравнению с контролем В случае если эта величина меньше, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов, условий проведения опытов Если все правильно, то биосенсор не используется

15. Форма представления результатов анализа.

Результат токсикологического анализа в документах - индекс токсичности, предусматривающих его использование, представляется в виде

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

$\bar{X}$ — среднее арифметическое определений,

За результат анализа ($\bar{X}$) принимают среднее арифметическое результатов трех (или более - до 10) параллельных измерений индекса токсичности Индекс токсичности Т вычисляется по формуле Т=100 (Iконтр - Iопыт)/Iконтр, где Iконтр и Iопыт соответственно интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольной и опытной пробах

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

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

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

Приложение 1 (рекомендуемое)

аименование учреждения, выдавшего протокол

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

Аттестат аккредитации

Регистрация в реестре

ПРОТОКОЛ №

определения токсичности пробы с помощью биотеста «Эколюм»
и прибора «Биотокс-10»

Наименование учреждения/отдела
токсикологической оценки

вид испытаний

№ образца

от «» 2004г

Наименование образца

Наименование предприятия-изготовителя:

Наименование заявителя (отдела):

Упаковка, маркировка, описание образца

НД на методы испытаний:

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Показатели токсичности	**Критерии оценки**	**Вывод о степени токсичности пробы**
Индекс токсичности:	меньше 20 - допустимая степень токсичности, от 20 до 50 - образец токсичен, равно или больше 50 - образец сильно токсичен,	
Средняя величина EC20		

Испытания проведены:

(*Ф И О* лиц, проводивших испытание) (дата)

Заключение, рекомендации:
Вывод о токсичности образца

Результаты испытаний распространяются только на представленные образцы
Частичная перепечатка протокола запрещена

Ответственный специалист

Форма регистрации условий и результатов биотестирования ПК продукции по сравнению с эталоном, фототоксичности ПК продукции

ПРОТОКОЛ №
определения токсичности пробы с помощью биотеста «Эколюм»

Наименование организации	
Наименование пробы	
Дата, время приготовления пробы	
Дата измерения проб	
Число повторностей измерения проб	
Результаты биотестирования Усредненный индекс токсичности	
Погрешность измерения	
Оценка токсичности пробы	
Оператор, Ф И О	

gost.e-ecolog.ru