Государственная система санитарно-эпидемиологического нормирования 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 1.1.0119-17

Москва, 2017

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста (с применением измерительного прибора-люминометра типа «Биотокс-10»). МР 1.1.0119-17

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 22.12.2017.

3. **МР 1.1.0119-17 введены взамен МР № 01.038-08** «Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки парфюмерно-косметической продукции с помощью люминесцентного бактериального теста».

Содержание

Главы	Страницы
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

«22» 12 2017 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. 0119 -17

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, методика):

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;

средства индивидуальной защиты дерматологические (далее – ДСИЗ) (например: защитные средства гидрофильного, гидрофобного, комбинированного действия, от воздействия низких температур, ветра, от воздействия ультрафиолетового излучения диапазонов А, В, С, от воздействия биологических факторов; очищающие средства; регенерирующие, восстанавливающие средства).

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

Методика может быть применена 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 иных 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 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 «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.

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

2.3. Индекс токсичности «Т», равный отношению $T = 100x(I_o - I)/I_o$, где I_o 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 уровень - допустимая степень токсичности образца индекс токсичности Т меньше 20;

2 уровень - образец токсичен индекс Т равен или больше 20 и меньше 50;

3 уровень - образец сильно токсичен индекс токсичности Т равен или более 50.

Выбор эталонных разведений определялся результатами сравнительной оценки исследования общей токсичности и кожно-раздражающего действия ПК продукции в эксперименте на лабораторных животных и определения индекса токсичности перечисленных групп ПК продукции с учетом выше указанного допустимого интервала индекса токсичности.

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, ТУ 2639-236-00209792-01.

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 АФА-ВП-10, ТУ 95-743-80 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, химически чистые, 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 пункте 3 методических указаний.

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 объем жидкого образца (или навеску порошкового образца), заливают определенным объемом дистиллированной воды (комнатная температура, pH 7,0 - 7,4) и выдерживают определенное время (продолжительность экстракции).

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

ПК продукция, представляющая собой жиросодержащие средствами, требует периодического перемешивания в течение времени экстракции. В данных случаях после 1 часа экстракции осторожно отбирают водную фазу с помощью делительной воронки.

Средства для ухода за ногтями требуют предварительной подготовки. На предметное стекло (2см*2см) ровным слоем наносят исследуемую навеску (1 г) образца и оставляют при комнатной температуре до полного высыхания. Высушенную пробу переносят в сосуд с дистиллированной водой (комнатная температура, pH 7,0– 7,4).

Таблица 1

Условия приготовления водных экстрактов в зависимости от вида продукции

№	Вид ПК продукции	Масса или объем образца	Объем дистиллированной воды, мл	Степень разведения	Продолжительность экстракции, мин
1.	Продукция косметическая гигиеническая моющая; ДСИЗ (очищающие гели)	1 мл	20	1:20	10
2.	Жиросодержащие косметические средства; ДСИЗ (кремы, масла, скрабы/пасты неабразивные)	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
3.	Продукция косметическая жидкая, не содержащая спирт ДСИЗ (жидкие средства)	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
4.	Гели косметические; ДСИЗ (гели)	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
5.	Продукция декоративной косметики на эмульсионной основе	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
6.	Продукция косметическая для окрашивания, осветления, химической завивки и выпрямления волос	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
7.	Продукция косметическая на носителях; ДСИЗ на носителях	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60

№	Вид ПК продукции	Масса или объем образца	Объем дистилли-рованной воды, мл	Степень разведения	Продолжи-тельность экстракции, мин
8.	Пилинги, скрабы, эксфолианты; ДСИЗ (скрабы/пасты абразивные)	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
9.	Интимная косметика	0,1 мл или 0,1 г	100	1:1000	60
10.	Парфюмерная и косметическая спиртосодержащая продукция; ДСИЗ (жидкие спиртосодержащие средства)	1 мл	20	1:20	10
11.	Дезодоранты и депиляторы в аэрозольной упаковке; ДСИЗ в аэрозольной упаковке	0,1 мл	100	1:1000	10
12.	Продукция декоративной косметики порошкообразная и компактная, тальк, присыпки, зубные порошки	0,1 г	100	1:1000	10
13.	Кремы косметические для ухода за кожей лица, тела, волосами, ногтями, губами, кожей вокруг глаз; ДСИЗ (кремы, пасты)	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

№	Вид ПК продукции	Масса или объем образца	Объем дистиллированной воды, мл	Степень разведения	Продолжительность экстракции, мин
17.	Мыло туалетное твердое, соли для ванн, сухие средства для ванн	0,1 г	100	1:1000	60
18.	Зубные пасты	1 г	1000	1:1000	60
19.	Средства гигиены полости рта жидкие	1,0 мл	1000	1:1000	10
20.	Средства для домашнего отбеливания зубов	1 г	1000	1:1000	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, pH 7,0 - 7,4 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 сек 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 (pH 7,0 - 7,4, комнатная температура).

4.5.2. 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 биосенсер стал меньше растворяться 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 (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 в соответствии с таблицей 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 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 ($ZnSO_47H_2O$). 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 в документах - индекс токсичности, предусматривающих его использование, представляется в виде:

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

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 $T = 100x(I_{контр} - I_{опыт})/I_{контр}$, где $I_{контр}$ и $I_{опыт}$ 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.

V. Оценка результатов испытаний

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

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.

4.6.3. По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на три группы в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Классификация токсичности проб

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

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 альтернативными методами или методами in vivo.