

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель
Министра здравоохранения -
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь
И.В. Гаевский
_____ 2012 г.
Регистрационный № 017-7772

МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ IN VITRO ДЛЯ ОЦЕНКИ
РАЗДРАЖАЮЩЕГО И ИРРИТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ
КОМПОЗИЦИЙ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.б.н. Г.И. Эрм, к.м.н. Ю.А. Соболев, к.м.н. Е.В. Чернышова,
А.В. Буйницкая, Т.С. Студеничник, В.В. Кравцова

Минск, 2012

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) предназначена для оценки показателей раздражающего слизистые оболочки и кожу действия парфюмерно-косметической продукции (далее – ПКП).

2. Настоящая Инструкция по применению распространяется на парфюмерно-косметическую продукцию: средства для ухода за кожей лица, тела, волосами и ногтями, средства гигиенические моющие, декоративную косметику, средства гигиены полости рта.

3. Настоящая Инструкция устанавливает требования к следующим методам определения и оценки раздражающего слизистые оболочки и кожу действия ПКП: метод оценки ирритативного действия косметической продукции на хориоаллантоисной мембране куриного эмбриона, оценка раздражающего действия косметической продукции методом определения мембранолитической активности *in vitro*.

4. Настоящая Инструкция предназначена для специалистов лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за безопасностью и безвредностью для человека ПКП.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5. Для целей настоящей Инструкции используются следующие термины и определения:

Доза – объём, вводимый в тест-систему за один приём.

Ирритативное действие – способность ПКП вызывать раздражение слизистой оболочки глаз.

Исследуемый материал – материал, изделие, его часть или компонент, пробу которых подвергают биологическому или химическому испытанию.

Испытуемая проба – экстракт или порция исследуемого материала, которую подвергают биологическому или химическому испытанию.

Контрольная проба – порция раствора, приготовленная так же, как и идентичный раствор, используемый для подготовки исследуемых образцов, предназначенная для определения фонового ответа растворителя.

Раздражение – локализованный неспецифический воспалительный ответ на однократное, повторное или продолжительное применение вещества/материала.

· Раздражитель – агент, производящий раздражение.

Растворитель – материал или вещество, используемое для смачивания, разбавления, суспензирования, экстрагирования или растворения материала испытуемого вещества (например, химикат, наполнитель, среда и т.д.).

ГЛАВА 3 МЕТОД ОЦЕНКИ ИРРИТАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ МЕМБРАНЕ КУРИНОГО ЭМБРИОНА

6. Суть метода оценки ирритативного действия косметической продукции на хориоаллантаоисной мембране куриного эмбриона заключается в возникновении сосудистого повреждения в ответ на воздействие испытуемой пробы, что является показателем потенциала исследуемого материала повреждать слизистые оболочки (в частности, глаз).

По изменению, которое может возникнуть в хориоаллантаоисной мембране куриного эмбриона (увеличение сети капилляров, точечные и крупные кровоизлияния) при нанесении на нее испытуемой пробы судят о потенциальной способности исследуемого материала вызывать раздражение.

7. Объект исследования.

Объектом исследования являются яйца с 9-дневным куриным эмбрионом.

8. Оборудование и материалы:

инкубатор с автоматическим вращающимся элементом (оптимальная температура: $38,5^{\circ}\text{C} (\pm 0,5^{\circ}\text{C})$, относительная влажность $62,5\% (\pm 7,5\%)$;

подставка для яиц;

секундомер;

пинцет медицинский;

заостренный пинцет;

весы аналитические;

дозаторы пипеточные автоматические;

наконечники одноразовые для дозаторов;

фильтровальная бумага;

люминесцентная лампа;

стереоскопический микроскоп

- рН-метр;
- вода дистиллированная;
- натрия хлорид (NaCl);
- натрия додецилсульфат;
- медицинское оливковое масло.

9. Подготовка к испытаниям.

Приготовить следующие растворы:

0,9% раствор NaCl в дистиллированной воде

1% раствор натрия додецилсульфата в дистиллированной воде

Испытания проводятся на трех куриных эмбрионах. Яйца размещаются ровно на лотках инкубатора при 37,5°C и вращаются в течение 7 дней для предотвращения прилипания эмбриона к одной стороне яйца. Необходимо проверять температуру и влажность в одно и то же время каждый день. На 8 день яйца следует просветить и отбраковать все нежизнеспособные яйца. Поместить яйца обратно в инкубатор тупыми концами вверх, но не вращать их, тем самым обеспечивая доступность хориоаллантоисной мембраны. На 9 день подготовить яйца для исследования.

Не допускается взбалтывание, излишний наклон и любые другие механические раздражения яиц при их подготовке для проведения исследований.

Из поступивших на испытания образцов одного наименования и названия (не менее двух единиц) составляют объединенную равнопропорциональную пробу общим весом (объемом) не менее 10 г (см³), а средств ухода за зубами и полостью рта, косметических средств для губ – не менее 25 г (см³). Из образцов твердой консистенции перед смешиванием готовят 50%-ные растворы или суспензии. При работе с гидрофильными веществами в качестве растворителя используют 0,9% раствор NaCl. При работе с гидрофобными веществами в качестве растворителя используют медицинское оливковое масло.

Объединенную пробу тщательно перемешивают.

Для ПКП вязкой консистенции готовится навеска на бумажных подложках, твердой консистенции – в стаканчиках.

Нецелесообразно проведение определения и оценки показателя раздражительного действия на слизистые оболочки глаз, вследствие заведомого наличия раздражающего слизистые оболочки действия, следующих ПКП:

материал и (или) готовый продукт, вызывающий сильное раздражение кожи;

материал и (или) готовый продукт, рН которого ≤ 2 или $\geq 11,5$;

продукция, содержащая этиловый спирт и/или органические растворители в концентрации более 25% по объему, используемая без

разведения;

лаки для ногтей, кроме лаков для ногтей на водной основе, средства для отбеливания и наращивания ногтей;

дезодоранты, дезодоранты-антиперспиранты, антиперспиранты;
окислительные краски для волос, средства для осветления и мелирования;

средства для химической завивки и средства для выпрямления волос на основе тиоловых соединений;

средства для депиляции на основе тиогликолевой кислоты;

соли для ванн;

100%-ные эфирные масла;

средства для отбеливания зубов, содержащие перекись водорода или другие компоненты, выделяющие перекись водорода, включая перекись карбамида и перекись цинка, с концентрацией перекиси водорода (в качестве ингредиента или выделяемой) от 0,1% до 6,0%;

средства для автозагара;

средства, содержащие в составе абразивные включения;

средства для укладки волос пленкообразующие, воски, пасты.

10. Проведение исследований.

Маркером отметить воздушную полость, медицинским пинцетом удалить отмеченный участок скорлупы. Аккуратно смочить мембрану 0,9% раствором NaCl при 37°C. Поместить яйца обратно в инкубатор до готовности для исследования (максимум 30 минут между открытием яиц и началом исследования).

Через 30 минут из извлеченного из инкубатора открытого яйца слить 0,9% раствор NaCl, аккуратно удалить мембрану без повреждения нижележащих кровеносных сосудов, используя заостренный пинцет.

Добавить пипеточным дозатором жидкий испытуемый образец или образец вязкой консистенции в нативном виде, 50%-ные растворы или суспензии из навесок продукции порошкообразной консистенции или предварительно измельченной твердой в 0,9% растворе NaCl или медицинском оливковом масле в количестве по 0,05 см³.

Через 5 минут аккуратно смыть испытуемый материал 0,9% раствором NaCl или 1% раствором натрия додецилсульфата в дистиллированной воде и зарегистрировать реакцию хориоаллантоисной мембраны на воздействие испытуемой продукции по следующей схеме:

отсутствие видимой гиперемии, четкий сосудистый рисунок;

увеличение сети капилляров, сосуды инъецированы (расширены);

точечные кровоизлияния, отдельные сосуды трудно различить;

крупные кровоизлияния, диффузное глубокое покраснение;

денатурация (денатурация белка внутрисосудистая и внесосудистая).

11. Обработка и оценка результатов.

Характеристику выраженности симптомов раздражения хориоаллантоисной мембраны и их оценку в баллах проводят по разработанной нами классификационной схеме, по аналогии с классификацией по выраженности ирритативного действия, применяемой в эксперименте на лабораторных животных согласно таблице 1.

Таблица 1 – Оценка симптомов ирритативного действия исследуемого образца на хориоаллантоисную мембрану куриного эмбриона

Эмбрион (хориоаллантоисная мембрана)	Оценка, балл	Выраженность раздражающего действия
Отсутствие видимой гиперемии, четкий сосудистый рисунок	0	Отсутствие
Увеличение сети капилляров, сосуды инъецированы (расширены)	1	Слабое
Точечные кровоизлияния, отдельные сосуды трудно различить	2	Умеренное
Крупные кровоизлияния, диффузное глубокое покраснение	3	Выраженное
Денатурация (денатурация белка внутрисосудистая и внесосудистая)	4	Резко выраженное

Индекс ирритативного действия исследуемого материала на хориоаллантоисную мембрану куриного эмбриона (I_{ir}) в баллах вычисляют по формуле:

$$I_{ir} = (R_1 + R_2 + R_3)/n,$$

где:

R – выраженность гиперемии в баллах,

n – количество куриных эмбрионов.

За результат исследования принимают среднее арифметическое результатов определения изменений на хориоаллантоисной мембране трех куриных эмбрионов.

ГЛАВА 4

ОЦЕНКА РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ КОСМЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ МЕТОДОМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕМБРАНОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ IN VITRO

12. Метод оценки *in vitro* раздражающего действия косметической продукции заключается в определении мембранолитической активности исследуемого материала в отношении эритроцитов млекопитающих, которая является мерой его цитотоксичности, а также способности вызывать раздражение.

Анализ лизиса красных кровяных телец представляет простую систему исследования, использующую легкодоступные клетки. Поэтому, он крайне удобен в качестве скринингового метода первого порядка в наборе исследований *in vitro* для оценки способности вызывать раздражение.

Метод не подходит для анализа нерастворимых и интенсивно окрашенных соединений, продукции, содержащей этиловый спирт, материалов, рН которых ≤ 2 или $\geq 11,5$.

13. Оборудование и материалы:

- весы аналитические;
- рН-метр;
- фотоэлектроколориметр типа КФК-2 или многоканальный спектрофотометр для планшет;
- центрифуга лабораторная;
- мешалка магнитная;
- дозаторы пипеточные автоматические;
- наконечники одноразовые для дозаторов;
- посуда лабораторная (стаканы химические, пробирки центрифужные (или планшеты круглодонные и плоскодонные));
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- диметилсульфоксид;
- натрия хлорид;
- калия хлорид;
- глюкоза;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный);
- вторичный кислый фосфат калия (безводный);
- кровь баранья консервированная

14. Подготовка к исследованиям.

Для приготовления взвеси эритроцитов можно использовать кровь консервированную (например, баранью) либо кровь (с антикоагулянтом)

белых крыс или морских свинок. Кровь разбавляется в объемном соотношении 4:10 фосфатно-солевым буферным раствором (далее – ФБ) (способ приготовления ФБ см. в Приложении 2) и раствор центрифугируется при 1500 об./мин при комнатной температуре в течение 10 минут, после чего надосадочная жидкость удаляется. Эритроцитарная масса ресуспендируется ФБ до общего объема 10 мл, осторожно перемешивается и центрифугируется снова, как описывалось ранее. Весь процесс повторяется, чтобы произвести всего три «промывки».

После отмывания надосадочная жидкость должна быть прозрачна, бесцветна, не иметь следов гемолиза. Если надосадочная жидкость не отвечает указанным требованиям, эритроциты не могут быть использованы для приготовления взвеси эритроцитов.

Из полученного осадка готовят рабочую 2% суспензию эритроцитов: осадок разводится ФБ в примерном соотношении 1:50.

Концентрацию эритроцитов стандартизируют измерением оптической плотности лизата клеток (1 мл пробы суспензии эритроцитов с 9 мл дистиллированной воды) на фотоэлектроколориметре. Желаемая оптическая плотность эквивалентна $0,5 \pm 5\%$ при 540 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. В качестве нулевой пробы используется дистиллированная вода.

Приготовленную взвесь эритроцитов допускается хранить в холодильнике не более 5 суток; если до окончания этого срока обнаруживаются признаки гемолиза, проба должна быть отбракована.

15. Приготовление проб: контрольной и со 100% гемолизом.

Контрольная проба готовится путем смешения 1 объема взвеси эритроцитов и 3 объемов ФБ. При добавлении к 1 объему взвеси эритроцитов 3 объемов дистиллированной воды происходит полное разрушение эритроцитов, что соответствует 100% гемолизу.

Контрольная проба и проба со 100% гемолизом готовится для каждого образца эритроцитарной взвеси.

16. Проведение исследований.

Исследуемые материалы растворяются в ФБ при анализируемых концентрациях в мг/л согласно Приложению 3. Один объем взвеси эритроцитов добавляется к трем объемам испытуемого материала в ФБ. Каждая проба приготавливается и анализируется в 3-х повторностях.

Для испытуемых материалов, нерастворимых в ФБ, в качестве среды используется диметилсульфоксид до 10% (конечная концентрация). Затем гемолиз может быть оценен, как описано выше; при этом проба, подвергшаяся 100% полному лизису, все испытуемые разбавления и контрольная проба должны содержать 10% диметилсульфоксида.

Анализируемые смеси инкубируются в течение 60 минут при комнатной температуре с периодическим перемешиванием.

После инкубации пробы центрифугируются 10 мин при 3000 об./мин.

Все манипуляции по отношению к контролю и пробе со 100% гемолизом проводятся параллельно с опытными пробами. После центрифугирования необходимо отделить надосадочную жидкость для проведения измерений оптической плотности.

Опытные, контрольную пробу и пробу со 100% гемолизом измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 540 нм против ФБ. Толщина кюветы 1 см.

При использовании автоматического спектрофотометра для прочтения планшетов могут быть проведены аналогичные измерения поглощательной способности при 540 нм; при применении данного метода не ожидается существенной разницы по сравнению с результатами, получаемыми с использованием фотоэлектроколориметра.

16. Обработка и оценка результатов.

Расчет процента гемолиза производится по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{он.}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \cdot 100,$$

где $E_{\text{он.}}$ – оптическая плотность опытной пробы,

$E_{\text{к}}$ – оптическая плотность контрольной пробы,

E_{100} – оптическая плотность пробы со 100% гемолизом.

Рекомендуемая концентрация испытуемого вещества не должна вызывать лизис более 50% эритроцитов.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Методы тестирования in vitro
для оценки раздражающего и
ирритативного действия
химических композиций
(парфюмерно-косметической
продукции)»

Шкала оценки ирритативного действия парфюмерно-косметической
продукции при тестировании на хориоаллантоисной мембране куриного
эмбриона

Вид продукции	Оценка, балл (не более)	Выраженность раздражающего действия
Средства для чувствительной кожи, для детей, интимная косметика, декоративная косметика	0	Отсутствие
Средства для ухода за кожей лица, тела, ногтями и волосами	1	Слабое
Средства гигиенические моющие (шампуни, гели для душа, средства очищающие, пены для ванн, мыло жидкое и т.д.)	2	Умеренное

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Методы тестирования in vitro
для оценки раздражающего и
ирритативного действия
химических композиций
(парфюмерно-косметической
продукции)»

Информация о составе и приготовлении фосфатно-солевого буферного раствора

Натрия хлорид	8,0 г
Калия хлорид	0,2 г
Глюкоза	1,8 г
Натрий фосфорнокислый двузамещенный (безводный)	1,15 г
Вторичный кислый фосфат калия (безводный)	0,2 г

Довести до 1 литра дистиллированной водой.

pH раствора должен составлять 7,2-7,4.

Буферный раствор хранить при 4°C не более недели.

Приложение 3
к Инструкции по применению
«Методы тестирования in vitro
для оценки раздражающего и
ирритативного действия
химических композиций
(парфюмерно-косметической
продукции)»

Рекомендуемые концентрации косметических средств для определения
мембранолитической активности

Вид косметической продукции	Концентрация, мг/л
Гигиенические моющие средства (гель для душа, шампунь для волос, пена для ванн, мыло жидкое)	200
Средства по уходу за кожей (крем, молочко, маска, гель, лосьон)	3000
Средства по уходу за волосами (бальзам, кондиционер, маска)	10000