

Государственная система санитарно-эпидемиологического
нормирования Российской Федерации

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ СПИРТОВ И ВОДОК
ЭКСПРЕСС-МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА
СПЕРМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Методические рекомендации

Минздрав России

МОСКВА

2001 г.

Предисловие

Разработаны Научно-исследовательским институтом наркологии Государственного научного центра психиатрии и наркологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (Нужный В.П.), Центром государственного санитарно – эпидемиологического надзора в городе Москве (Завьялов Н.В.), Всероссийским научно-исследовательским и испытательным институтом медицинской техники Министерства здравоохранения Российской Федерации (Еськов А.П.) , Акционерным обществом "БМК-ИНВЕСТ" (Каюмов Р.И.) при участии Федерального центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Российской Федерации (Скачков В.Б., Двоскин Я.Г.).

Содержание

1. Область применения	5
2. Сущность метода	6
3. Средства измерения, оборудование и реактивы	7
4. Отбор и приготовление образцов	7
5. Проведение испытаний	7
6. Оценка результатов испытаний	10
Приложение 1	10

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель главного

государственного санитарного

врача Российской Федерации

Е.Н.Беляев

« 25 » апреля 2001 г.

МР № ФЦ/1504

**ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ СПИРТОВ И ВОДОК
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА СПЕРМЫ КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА**

Методические рекомендации

Область применения

Методические рекомендации предназначены для токсикологической оценки спиртов и водок .

Экспресс-метод может быть применен для оценки безопасности спиртов, водок и водок особых в сочетании с другими методами, предусмотренными ГОСТ Р 51698-2000 «Водка и спирт этиловый. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей». Метод не может быть использован для оценки безопасности других видов алкогольной продукции.

Методические рекомендации содержат описание экспресс-метода и определяют порядок проведения токсикологических испытаний спиртов и водок с целью обеспечения безопасности их применения для потребителя.

1. Сущность метода

Сущность метода состоит в исследовании острой токсичности водных растворов спиртов и водок с применением клеточного тест-объекта. В качестве тест-объекта используется кратковременная суспензионная культура подвижных клеток - 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. В основе метода лежит исследование изменения зависимости двигательной активности сперматозоидов от времени воздействия химических соединений, содержащихся в водных растворах спиртов или водок. Показатель подвижности, $m = f(t)$ определен как :

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

где d - постоянный коэффициент,
 Cn - концентрация подвижных клеток,
 $\bar{V}$ - средний модуль скорости клеток.

Оценка показателя подвижности осуществляется путем подсчета изменений интенсивности светового потока при движении сперматозоидов через оптический зонд.

Данный вид испытаний позволяет с минимальными затратами времени и средств сделать выводы о токсичности водных растворов спиртов или водок .

2.Средства измерения, оборудование и реактивы

2.1.Стенд для испытаний спиртов и водок на токсичность (приложение 1, рекомендуемое).

2.2.Комплект кювет (приложение 1, рекомендуемое).

2.3.Химическое оборудование:

- пробирки с притертыми пробками объемом 3-5 мл - 10 шт.,
- дозаторы пипеточные на объемы 0,5 мл, 0,2 мл и 0,1 мл,
- мерные колбы с притертыми пробками объемом 50 мл - 2 шт.,

2.4.Весы аналитические с погрешностью взвешивания не более 1мг,

2.5.Пинцет анатомический длиной 250 мм,

2.6.Сосуд Дьюара типа СДС, объемом не менее 25 л и диаметром горла не менее 50 мм - 2 шт.,

2.7.Глюкоза ч., ГОСТ 6038-74.

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

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

3.10 Спирт этиловый марки «Экстра» (ГОСТ 12712-80 с изменениями N 1-Б-1983 г. Водки и водки особые), используется в качестве эталона.

3.Отбор и приготовление образцов

Для проведения испытаний производится отбор образцов из партии продукции в количестве, обеспечивающем получение средней пробы не менее 50 г .

4. Порядок проведения испытаний

4.1. Все растворы в течение эксперимента должны постоянно находиться при постоянной температуре $(40 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$. Поддержание температуры осуществляется автоматически устройством термостатирования.

4.2. Для оценки токсичности опытного раствора необходимо сравнить его с контрольным (модельным) раствором. В качестве контрольного раствора выбран образец эталонного этилового спирта (п. 3.10), в концентрации 0,025 объемной доли этилового спирта. Этот водный раствор доводится до изотонии сухими реактивами глюкозы и цитрата натрия (глюкоза - 4 г, цитрат натрия - 1 г, контрольный раствор - 100 мл). Опытным раствором является водный раствор исследуемого спирта или водки в концентрации 0,025 объемной доли этилового спирта, доведённый до изотонии сухими реактивами глюкозы и цитрата натрия (глюкоза - 4 г, цитрат натрия - 1 г, испытуемый раствор - 100 мл). Контрольный и опытный растворы по 0,4 мл помещают в пробирки с притертыми пробками и ставят в водяную баню при температуре $(40 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$. Контрольный и опытный растворы приготавливают заранее, за час до начала эксперимента.

4.3. Оттаивают замороженную сперму. Для этого дозируют в пробирки разбавитель (глюкоза - 4 г, цитрат натрия - 1 г, дистиллированная вода - 100 мл) согласно паспорту на сперму быка и ставят их в водный термостат при температуре $(40 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$. Охлажденным до температуры жидкого азота анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и быстро опускают в нагретый раствор.

Не допускается оттаивать несколько гранул в одной пробирке!

Сразу после размораживания содержимое пробирок с целью приготовления маточного раствора спермы сливают в пробирку и тщательно перемешивают.

4.4. Приготавливают рабочие образцы. В каждую пробирку контрольной и опытной серий помещают по 0,1 мл маточного раствора спермы.

4.5. Подготавливают пробы к исследованию. Каждый рабочий образец переносят в кювету.

4.6. Кювету устанавливают в каретку и помещают в стенд для испытания спиртов и водок.

4.7. Проводят накопление экспериментальных данных. Нажатием кнопки "ПУСК" на стенде для испытаний включают процесс накопления данных. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех кюветах отжатием кнопки "ПУСК" на стенде для испытаний производят остановку процесса накопления данных.

4.8. Проводят обработку экспериментальных данных. Для каждой кюветы контрольной и опытной групп вычисляют суммарную двигательную активность S :

$$S_j^{kn} = \sum_i m_i, \quad S_j^{on} = \sum_i m_i,$$

где m_i - i -ое значение показателя подвижности,

i - текущий номер оценки показателя подвижности.

Полученные экспериментальные данные подвергают статистической обработке с

использованием критерия t – Стьюдента. Для контрольной и опытной групп

вычисляют среднее арифметическое значение $\bar{S}_{cp}^{kn}$ и $\bar{S}_{cp}^{on}$:

$$\bar{S}_{cp}^{kn} = \frac{\sum S_j^{kn}}{n^{kn}} \text{ и } \bar{S}_{cp}^{on} = \frac{\sum S_j^{on}}{n^{on}},$$

где n^{kn} ; n^{on} - число кювет в контрольной и опытной группах

соответственно. Вычисляют нормированное отклонение t и число степеней

свободы f:

$$t = \frac{\bar{S}_{cp}^{KH} - \bar{S}_{cp}^{on}}{\sqrt{\frac{\sum (S_j^{KH} - \bar{S}_{cp}^{KH})^2 + \sum (S_j^{on} - \bar{S}_{cp}^{on})^2}{(n^{KH} - 1) + (n^{on} - 1)}} \cdot \left(\frac{n^{KH} + n^{on}}{n^{KH} \cdot n^{on}} \right)},$$

$$f = n^{KH} + n^{on} - 2.$$

По таблице для уровня значимости $\alpha = 0,05$ сравнивают вычисленное значение нормированного отклонения с табличным.

Таблица

Значения t при уровне значимости ($\alpha = 0,05$)

Число степеней свободы f	t при уровне значимости ($\alpha = 0,05$)
4	2,78
5	2,57
6	2,45
7	2,37
8	2,31

5. Оценка результатов испытаний

Если вычисленное значение нормированного отклонения меньше табличного, то делают вывод, что токсичность испытуемого образца не превышает токсичности стандартного образца.

В остальных случаях делают вывод, что токсичность испытуемого образца выше токсичности стандартного образца. В этой ситуации испытуемый образец следует подвергнуть расширенным санитарно – химическим и токсикологическим исследованиям.

Приложение 1 (Рекомендуемое)

Стенд для испытаний спиртов и водок на токсичность

1. Назначение

1.1. Стенд для испытания вытяжек на токсичность (далее стенд) предназначен для исследования острой токсичности спиртов и водок с применением клеточного тест-объекта.

2. Краткое техническое описание стенда

2.1. Принципиальная схема стенда должна соответствовать приведенной на рис 1.

Стенд содержит кюветы (капилляры) 1, каретку 2, привод 3, блок термостатирования 4, лазер 5, светоделительную пластину 6, микрообъектив 7, светоделительную пластину 8, экран 9, маску 10, фотодиод 11, усилитель 12,

контроллер 13, компьютер 14, принтер 15, блок подготовки проб и рабочих образцов 16.

Конструктивное исполнение стенда обеспечивает одновременное оценивание подвижности суспензии рабочего образца и визуальное наблюдение за клетками суспензии.

2.2. Проведение испытаний

Включают стенд. С помощью компьютера 14 задают контроллеру 13 необходимые значения температуры каретки и блока пробоподготовки, время одного анализа, количество используемых в данном эксперименте капилляров. После получения на дисплее компьютера информации о достижении заданных значений температур проводят приготовление рабочих образцов в соответствии с п.5.7. Переносят рабочие образцы в капилляры и герметизируют. Помещают кюветы с рабочими образцами 1 на каретку 2 и устанавливают в привод 3. Проводят идентификацию капилляров и запускают процесс накопления экспериментальных данных. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех капиллярах останавливают процесс накопления экспериментальных данных и проводят их математическую обработку по алгоритмам, приведенным в п. 4.8. Результаты расчетов распечатывают на принтере 15 и записывают в базу данных. При необходимости, происходящее в капиллярах с рабочими образцами наблюдают визуально на экране 9. Поддержание необходимой температуры каретки и на блоке пробоподготовки, а также перемещение каретки осуществляется автоматически контроллером 13 и компьютером 14.

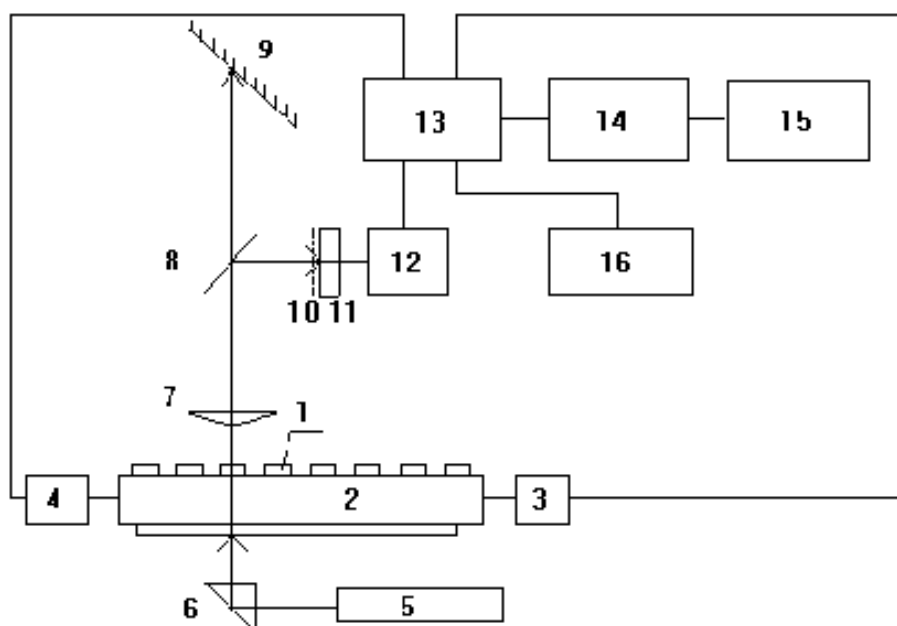


Рис. 1. Стенд для испытаний спиртов и водок на токсичность

1 – капилляр, 2 - каретка, 3 - привод, 4 - блок термостатирования, 5 - лазер, 6 - светоделительная пластина, 7 - микрообъектив, 8 - светоделительная пластина, 9 - экран, 10 - маска, 11 - фотодиод, 12 - усилитель, 13 - контроллер, 14 - компьютер, 15 - принтер, 16 - блок подготовки проб и рабочих образцов.

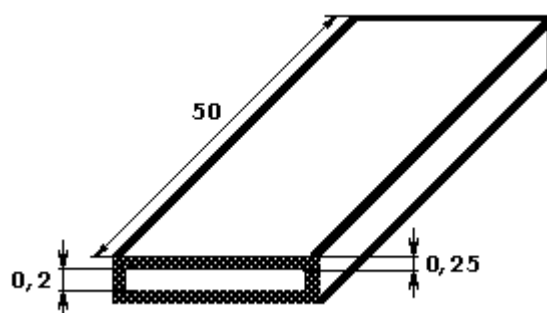


Рис 2. Кювета (капилляр)

3. Технические характеристики стенда для испытаний

- 3.1. Длина волны лазерного излучения - 0,63 мкм.
- 3.2. Мощность лазерного излучения не менее 1 мВт.
- 3.3. Время одного анализа от 10 до 300 с шагом 10 с.
- 3.4. Время перемещения капилляра с образцом не более 2 с.

3.5. Время обратного хода каретки не более 15 с.

3.6. Изменение температуры проб и рабочих образцов в диапазоне (35-45)°С с шагом 1°С и с отклонением температуры от установленного значения $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

3.7. Основные размеры кюветы должны соответствовать приведенным на рис. 2