

Утверждаю
Заместитель Главного
государственного
санитарного врача СССР
В.Е.КОВШИЛО
8 декабря 1978 г. N 1943-78

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ПРИМЕНЕНИЮ РАСЧЕТНЫХ И ЭКСПРЕСС-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ
МЕТОДОВ ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ ХИМИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

Методические указания предназначены для научно-исследовательских институтов гигиенического профиля и гигиенических кафедр медицинских институтов.

Методические указания определяют область применения и принципы использования ускоренных методов гигиенического нормирования веществ в воде водоемов с целью повышения эффективности исследований по обоснованию ПДК и сокращения сроков их проведения.

1. Общие положения

1.1. Настоящие Методические указания подготовлены в помощь организациям, разрабатывающим ПДК <*> вредных веществ в воде водоемов, с целью более полного и эффективного удовлетворения потребностей народного хозяйства и решения задач охраны окружающей среды за счет использования современных методов, позволяющих в определенных случаях существенно сократить объем и ускорить исследования по гигиеническому нормированию.

<*> Перечень сокращений, символов и специальных терминов, Приложение 1.

1.2. Указания отражают основные положения "Методических указаний по разработке и научному обоснованию предельно допустимых концентраций вредных веществ в воде водоемов" (N 1296-75), развивая намеченные в последних подходы к ускоренному нормированию путем выбора и обобщения с учетом накопленного опыта исследований в этом направлении, наиболее информативных и надежных методических приемов.

1.3. Принципиальной основой настоящих Методических указаний являются положения о правомерности:

1) прогнозирования пороговых и подпороговых доз химических соединений по санитарно-токсикологическому признаку вредности с помощью следующих методов:

- а) расчетных - на основе корреляционного и регрессионного анализа;
- б) экспресс-экспериментальных;

2) использования полученных данных в сочетании с экспериментально найденными пороговыми концентрациями по органолептическому и общесанитарному признакам вредности для гигиенического регламентирования содержания вредных веществ в воде водных объектов.

1.4. Экспериментальное изучение влияния химических соединений на органолептические свойства воды и общий санитарный режим водоемов (с определением соответствующих пороговых концентраций), а также стабильности и токсичности при однократном (п. 2.5.1) и кратковременном повторном введении внутрь (раздел 2) является обязательным условием применения ускоренных методов нормирования, гарантирующим гигиеническую надежность устанавливаемых нормативов.

1.5. Использование приведенных в настоящих Методических указаниях приемов определяет возможность применения дифференцированного подхода к гигиеническому нормированию химических соединений в воде водных объектов, позволяющего определить оптимальный объем необходимых исследований (схема этапного исследования при гигиеническом нормировании).

1.6. Нормативные величины, разработанные с применением комплекса ускоренных методов по схеме, изложенной в разделе 2, и с учетом требований п. 1.4 настоящих Методических указаний, в основном являются временными и ориентировочными, приравниваются к ОБУВ.

1.7. В отдельных случаях, определяемых потребностями развития народного хозяйства и гигиенической практики, с помощью приведенных в настоящих Методических указаниях расчетных методов могут разрабатываться нормативы веществ по санитарно-токсикологическому признаку вредности, имеющие ориентировочный характер (ОБУВ).

1.8. В ряде случаев нормативные величины, разработанные с применением комплекса ускоренных методов по схеме, изложенной в разделе 2 с учетом п. 1.4 настоящих Методических указаний, а также с использованием расчетных методов, могут иметь тот же статус и сферу применения, что и ПДК, разработанные в соответствии с "Методическими указаниями по разработке и научному обоснованию предельно допустимых концентраций вредных веществ в воде водоемов".

Этот вопрос в каждом конкретном случае решается секцией гигиены воды и санитарной охраны водоемов Проблемной комиссии "Научные основы гигиены окружающей среды" АМН СССР в соответствии с материалами исследований, представляемыми институтами-разработчиками.

1.9. При расчете ОБУВ используются данные о физико-химических свойствах вещества, токсикологические параметры ПДК изучаемого вещества в других объектах окружающей среды (воздухе рабочей зоны, атмосферном воздухе).

Не допускается рассчитывать ОБУВ изучаемых веществ только на основании их физико-химических свойств.

1.10. Для расчета ОБУВ могут использоваться только формулы, включенные в настоящие Методические указания или предварительно апробированные секцией гигиены воды и санитарной охраны водоемов Проблемной комиссии "Научные основы гигиены окружающей среды" АМН СССР.

1.11. ОБУВ могут применяться на стадиях лабораторных исследований, опытно-промышленных разработок и испытаний новых веществ, продуктов, технологических схем и процессов.

1.12. Не подлежат ориентировочному гигиеническому нормированию с применением расчетных и экспериментальных методов, приведенных в настоящих Методических указаниях, вещества и их группы, представляющие потенциальную опасность развития отдаленных эффектов (канцерогенных, мутагенного, тератогенного, геро-эффекта и др.).

1.13. ОБУВ утверждаются Министерством здравоохранения СССР по представлению секции гигиены воды и санитарной охраны водоемов сроком до трех лет.

1.14. Выдача заинтересованным организациям, предприятиям, министерствам и ведомствам институтами-разработчиками неутвержденных ОБУВ запрещается.

2. Принципы ускоренного гигиенического нормирования химических соединений в воде водных объектов (схема этапного исследования при гигиеническом нормировании)

2.1. Основной особенностью предлагаемого подхода является оптимизация условий проведения экспериментальных токсиколого-гигиенических исследований и, в большинстве случаев, существенное сокращение их длительности и объема.

2.2. В основу этапных исследований при гигиеническом нормировании положено представление о различной степени опасности для человека химических соединений, загрязняющих воду водных объектов, в зависимости от соотношения количественных характеристик показателей их вредного действия.

2.3. Схема этапного исследования при гигиеническом нормировании (табл. 2.2) предусматривает взаимосвязь отдельных этапов исследований и позволяет определить последовательность получения информации и ее достаточность для обоснования ПДК изучаемого вещества в воде водоемов.

2.4. Для определения степени опасности вещества используется классификация, приведенная в табл. 2.1.

Таблица 2.1

**КЛАССИФИКАЦИЯ
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПО СТЕПЕНИ ОПАСНОСТИ <*>**

<*> Настоящая классификация применяется только в процессе разработки гигиенических нормативов для воды водных объектов.

Последовательность оценки	Критерии	Класс опасности			
		чрезвычайно опасные	высокоопасные	опасные	умеренно опасные
		1	2	3	4
I	МНК/ПК орг	-	< 1	1 - 10	> 10
	МНК/ПК сан	-	< 1	1 - 10	> 10
II	МНК	< 0,001 мг/л	0,001 - 0,1 мг/л	0,1 - 10 мг/л	10 мг/л
III	DL /МНД 50	6	6 5	5 4	4
IV <*>	ПД / отд ПД общ	< 1	1 - 10	10 - 100	> 100

<*> Проводится только для веществ, отнесенных к 1 - 3 классам опасности.

Таблица 2.2

**МЕТОДИЧЕСКАЯ СХЕМА
ЭТАПНОГО ОБОСНОВАНИЯ ГИГИЕНИЧЕСКИХ ПДК
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ <*>**

<*> Изучение влияния веществ на органолептические свойства воды и санитарный режим водных объектов, а также оценка стабильности веществ в воде проводится в полном объеме, независимо от используемого варианта схемы.

Этапы нормирования	Вариант схемы	Определение МНД	Класс опасности веществ, позволяющий завершить исследования на соответствующем этапе
I	Сокращенная схема	По результатам острого опыта и расчета ДК	4
II	Схема ускоренного нормирования	По результатам острого и подострого опытов и расчета МНД	3
III	Схема на основе хронического эксперимента	По результатам острого, подострого и хронического опытов и проверочных расчетов	2
IV	Развернутая (полная) схема	По результатам острого, подострого, хронического и пожизненного опытов и проверочных расчетов	1

2.4.1. Величины $ПК_{орг}$, $ПК_{сан}$, DL_{50} устанавливаются только экспериментальным путем: МНД, ПД_{общ} и ПД_{отд} - экспериментально и (или) расчетными методами.

2.4.2. Степень опасности каждого изучаемого вещества определяют последовательно (табл. 2.1) по мере получения экспериментальным или расчетным путем необходимых параметров (гр. 2, табл. 2.1).

При окончательной оценке вещество относят к наименьшему из определенных классов опасности.

2.5. Для определения объема и направленности исследований при токсиколого-гигиенической оценке веществ следует основываться на методических принципах, указанных в табл. 2.2.

2.5.1. Для веществ 4-го класса опасности, относящихся к гигиенически хорошо изученным химическим классам (группам, гомологическим рядам и т.п.) и не имеющих структурных аналогов, обладающих отдаленными эффектами, допустимо ограничение исследований сокращенной схемой (I этап).

Необходимый объем исследований на этом этапе включает экспериментальное определение пороговых концентраций веществ по влиянию на органолептические свойства воды, БПК₅, величины DL_{50} , ET с последующим расчетом МНК (раздел 3 и 4).

2.5.2. Ускоренная схема (II этап) применяется для веществ 4-го класса опасности, не удовлетворяющих вышеуказанным требованиям (п. 2.5.1), и для веществ 3-го класса опасности. Особенностью этого этапа является проведение подострых и экспресс-экспериментов (см. раздел 4).

Обязательным элементом II этапа является изучение отдаленных эффектов исследуемых соединений имеющимися экспрессными методами [Е.Н. Красовский и соавт., 1976, 1977] и расчет соотношения пороговых доз отдаленных эффектов к порогу общетоксического действия.

Если полученный коэффициент ≥ 10 , нет необходимости в дальнейшем изучении отдаленных эффектов. При значениях коэффициента < 10 он используется для корректировки доз планируемого хронического опыта (МНД, рассчитанная по общетоксикологическому эффекту, уменьшается на величину коэффициента), а сам хронический эксперимент должен включать изучение отдаленных эффектов.

2.5.3. Эмбриотоксический эффект на II этапе изучается в полном объеме (при недостаточной ясности результатов - с исследованием функционального состояния различных систем организма у развивающегося потомства). Необходимость исследования аллергенного действия решается на основании литературных данных об изучаемом веществе или его аналогах.

2.5.4. Если вещество относится ко 2-му классу опасности, необходимо проводить хронический 6-месячный эксперимент в соответствии с Методическими указаниями N 1296-75. Для веществ 1-го класса опасности исследования дополняются пожизненным экспериментом, включающим изучение канцерогенного и геро-эффектов.

2.6. Для повышения надежности рекомендуемых ПДК следует при выборе доз на всех этапах токсикологического исследования и при обосновании ПДК сопоставлять результаты экспериментов с соответствующими величинами, получаемыми с помощью расчетных методов.

2.7. С целью рационального планирования и проведения исследований по гигиеническому нормированию веществ, содержащихся в сточных водах сложного (многокомпонентного) химического состава, рекомендуется применение следующей методической схемы.

2.7.1. Основываясь на данных о физико-химических, технологических и гигиенических характеристиках исследуемых сточных вод, а также на прогнозных материалах по развитию соответствующих предприятий, выделяют ведущие компоненты стоков, которые определяют существующее или возможное загрязнение водоемов. Основным критерием отбора является возможность и широта контакта загрязняющих веществ с населением, определяемые объемом производства, возможными концентрациями в сточных водах, стабильностью в воде, наличием и эффективностью технологических и санитарно-технических мероприятий по предотвращению попадания веществ в водоемы и т.п.

2.7.2. Для выбранных ведущих загрязнителей разрабатываются величины ПДК с использованием расчетных и экспресс-экспериментальных методов по схеме этапного нормирования (табл. 2.2).

2.7.3. Исследованные (ведущие) и неисследованные компоненты стоков группируются по признаку общности физико-химических свойств, а затем, в пределах полученных групп, - по степени влияния на органолептические свойства воды, процессы естественного самоочищения и по токсикологическим параметрам.

2.7.4. Используя расчетные методы (раздел 3), проводят экстраполяцию имеющихся данных для отдельных веществ на все вещества в однородных группах и устанавливают для них величины ПДК.

3. Рекомендуемые расчетные методы

Предлагаемые методы основаны на использовании зависимостей, рассчитанных статистическим методом регрессионного и корреляционного анализа по заданным математическим моделям.

3.1. Для определения параметров хронической токсичности (ПД, МНД) и ПДК применяются уравнения, отражающие корреляционные связи между этими величинами, экспериментально установленными токсикологическими параметрами и физико-химическими константами веществ и представляющие численную меру парной корреляции между переменными значениями функций (ПД, МНД и ПДК) и известными значениями аргументов x_i , представленных на рис. 3.1.

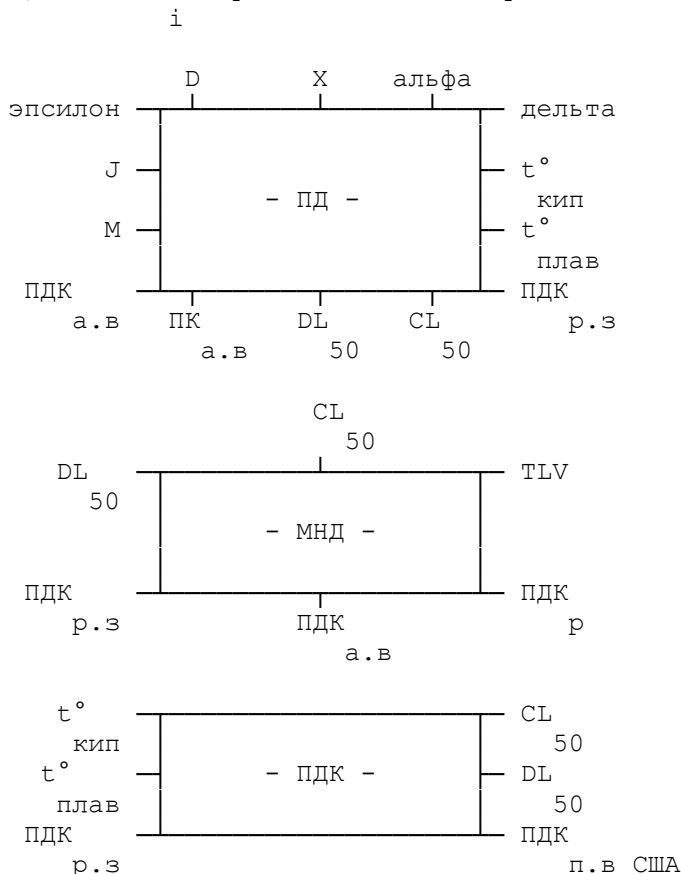


Рис. 3.1. Параметры, используемые при расчете ПД, МНД и ПДК на основе зависимости вида $ПД = f(x_i)$, $МНД = f(x_i)$,

$$ПДК = f(x_i).$$

3.2. В связи с тем, что достоверность корреляционных связей r между значениями аргументов и функций существенно повышается в пределах близких по химической структуре и свойствам групп веществ, при расчете ПД и МНД следует в первую очередь пользоваться формулами соответственно (1 - 12 и 22 - 29 табл. 3.1 и 3.2).

Таблица 3.1

ФОРМУЛЫ
ДЛЯ РАСЧЕТА ПД

Соединения	Формулы	№ формул
------------	---------	----------

Соединения, близкие по структуре или физическим свойствам		
Фосфор-органические	$\lg \text{ПД} = 0,99 \lg \text{DL} - 2,0$ 50	1
	$\lg \text{ПД} = 0,99 \lg \text{ПК} + 0,602$ р.э	2
Хлор-органические	$\lg \text{ПД} = 0,438 \lg \text{ПК} + 1,322$ р.э	3
	$\lg \text{ПД} = 1,28 \lg \text{DL} - 4,54$ 50	4
Нитросоединения	$\lg \text{ПД} = 0,679 \lg \text{DL} - 2,036$ 50	5
Углеводороды бензольного ряда	$\text{ПД} = 0,3 + 0,9 \text{D}$	6
	$\text{ПД} = 34 - 37 \text{ дельта}$	7
	$\text{ПД} = 0,94 + 1,2 \text{ эpsilon}$	8
Амино- и амидосоединения	$\text{ПД} = 0,66 + 0,023 \text{M}$	9
Кислородсодержащие вещества	$\text{ПД} = 1,1 + 0,1 \text{ альфа}$	10
Углеводороды, находящиеся при $T = 20^\circ \text{C}$ в твердом состоянии	$\text{ПД} = 0,4 + 0,08 \text{t}$ пл	11
Органические вещества, находящиеся при $T = 20^\circ \text{C}$ в жидком или газообразном состоянии (кроме кислот и одноатомных спиртов)	$\text{ПД} = 0,8 + 0,006 \text{t}$ кип	12
Соединения, не связанные общими физико-химическими характеристиками		
Совокупность всех соединений	$\lg \text{ПД} = 0,41 \lg \text{CL} - 0,50$ 50	13
	$\lg \text{ПД} = 0,65 \lg \text{ПК} - 0,37$ а.в	14

	$\lg \text{ПД} = 0,99 \lg \text{DL} - 2,83$ 50	15
	$\lg \text{ПД} = 0,617 \lg \text{ПДК} + 0,57$ а.в	16
	$\lg \text{ПД} = 0,74 \lg \text{ПДК} - 0,37$ р.э	17
Органические вещества, растворимые в воде	$\text{ПД} = 0,26 + 0,4x$	18
	$\text{ПД} = 0,27 + 6,25y$	19
Формулы, основанные на уравнениях множественной корреляции		
Хлорсодержащие	$\text{ПД} = 1,925 - 0,006 \text{DL} - 7,12 \text{ПДК} -$ 50 а.в 0,06 TLV	20
Металлы	$\text{ПД} = 0,205 + 0,0002 \text{DL} - 0,045 \text{ПДК} +$ 50 р.э	21
	$17,065 \text{ПДК} - 0,274 \text{TLV} - 0,013 \text{CL}$ а.в 50	

Таблица 3.2

ФОРМУЛЫ ДЛЯ РАСЧЕТА МНД

Соединения	Формулы	№ формул
Соединения, близкие по структуре или физическим свойствам		
Фосфорорганические	$\lg \text{МНД} = 0,76 \lg \text{DL} - 3,66$ 50	22
	$\lg \text{МНД} = 0,99 \lg \text{TLV} - 1,051$	23
	$\lg \text{МНД} = 1,099 \lg \text{ПДК} - 0,599$ р.э	24
Хлорорганические	$\lg \text{МНД} = 1,16 \lg \text{DL} - 5,495$ 50	25
Нитросоединения	$\lg \text{МНД} = 0,886 \lg \text{DL} - 3,602$ 50	26
Альдегиды и кетоны	$\lg \text{МНД} = 1,23 \lg \text{TLV} - 2,143$	27
Оловоорганические <*>	$\lg \text{МНД} = 0,78 \lg \text{DL} - 5,29$ 50	28

	$\text{МНД} = 3 \times 10^{-7} \frac{\text{ДЛ}}{50} / \frac{\text{К}}{\text{к}}$	29
Соединения, не связанные общими физико-химическими характеристиками		
	$\lg \text{МНД} = 0,45 \lg \frac{\text{СЛ}}{50} - 1,55$	30
	$\lg \text{МНД} = 0,88 \lg \frac{\text{ДЛ}}{50} - 3,54$	31
	$\lg \text{МНД} = 0,007 \lg \frac{\text{ПДК}}{\text{р}} - 0,991$	32
	$\lg \text{МНД} = 0,60 \lg \frac{\text{ПДК}}{\text{р.з}} - 1,31$	33
	$\lg \text{МНД} = 0,70 \lg \frac{\text{ПДК}}{\text{а.в}} + 1,22$	34
Формулы, основанные на уравнениях множественной корреляции		
Нитросоединения	$\text{МНД} = 0,166 - 0,00002 \frac{\text{ДЛ}}{50} + 0,0046 \frac{\text{ПДК}}{\text{р.з}} - 0,00066 \frac{\text{ТВЛ}}{50} - 0,0063 \frac{\text{СЛ}}{50}$	35
Металлы	$\text{МНД} = 0,062 - 0,00002 \frac{\text{ДЛ}}{50} + 0,015 \frac{\text{ПДК}}{\text{р.з}} - 4,637 \frac{\text{ПДК}}{\text{а.в}} - 0,084 \frac{\text{ТВЛ}}{50}$	36

 <*> Для расчета $\frac{\text{ДЛ}}{50}$ оловоорганических соединений могут использоваться следующие формулы (В.Т. Мазаев):

$$\lg \frac{\text{ДЛ}}{50} = 3,74 - 0,044 \text{ P},$$

$$\lg \frac{\text{ДЛ}}{50} = 0,78 + 0,0036 \text{ M}.$$

3.3. Если исследуемое вещество не может быть отнесено ни к одной из указанных в табл. 3.1 и 3.2 групп, ПД и МНД следует рассчитывать соответственно по формулам 13 - 19 и 30 - 34 (табл. 3.1 и 3.2), применимым для различных веществ, независимо от их химической структуры.

3.4. При наличии достаточной информации о параметрах острой токсичности исследуемого вещества и его ПДК в различных объектах окружающей среды для определения ПД и МНД можно использовать уравнения множественной корреляции, полученные для отдельных классов соединений (формулы 20 - 21, 35 - 36, табл. 3.1 и 3.2).

3.5. Для прогноза ПДК веществ, имеющих санитарно-токсикологический признак вредности (по сопоставлению величин $\text{ПК}_{\text{орг}}$, $\text{ПК}_{\text{сан}}$ и рассчитанных значений ПД и МНД), следует использовать формулы, приведенные в табл. 3.3.

Таблица 3.3

**ФОРМУЛЫ
ДЛЯ РАСЧЕТА ПДК ВЕЩЕСТВ В ВОДЕ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

Формулы	N формул
$\lg \text{ПДК} = -0,45 + 0,007 t$ пл	37
$\lg \text{ПДК} = 0,85 - 0,01 t$ кип	38
$\lg \text{ПДК} = -2,12 + 1,7 \lg \text{CL}$ 50	39
$\lg \text{ПДК} = -4,76 + 1,39 \lg \text{DL}$ 50	40
$\lg \text{ПДК} = 0,81 \lg \text{DL} - 0,81 \lg \frac{\text{DL}}{30 \times \text{CL}} - 0,64$ 50	41
$\lg \text{ПДК} = 0,61 \lg \text{ПДК} - 1,0$ р.э	42
$\lg \text{ПДК} = 0,99 \lg \text{ПДК} + 0,22$ п.в США	43
Формула, основанная на уравнении множественной регрессии:	
$\text{ПДК} = -2,46 + 0,26 \lg \text{CL} + 0,32 \lg \text{DL}$ 50 50	44

3.6. С целью повышения достоверности получаемых значений для расчета ПД, МНД и ПДК необходимо использовать максимально возможное количество формул (исходя из структуры вещества и имеющейся информации) с последующим сопоставлением и сравнительной оценкой полученных результатов. Следует учитывать, что надежность последних зависит от уровня достоверности формул (величины r) и от характера используемых в них параметров, значение которых возрастает в последовательности: физико-химические константы -> показатели острой токсичности -> величины ПДК в других объектах окружающей среды <*>.

<*> Формулы, приведенные в табл. 3.1 - 3.3, в пределах каждой группы располагаются в порядке возрастающей надежности (увеличение r).

3.7. При известных параметрах острой токсичности вещества (CL и DL) величина ПДК может быть рассчитана по номограмме (Приложение 2), построенной на основании формулы 44 (табл. 3.3).

3.8. При отсутствии информации, позволяющей получить расчетные параметры с помощью приведенных выше формул, можно использовать уравнения регрессии,

применяемые при регламентировании веществ в воздухе рабочей зоны (табл. 3.4). Использование этих уравнений предполагает расчетное получение параметров токсичности веществ при ингаляционном поступлении в организм. Эти параметры затем используются в качестве исходной информации при расчетном определении по уравнениям регрессии величин пороговых, максимально недействующих и предельно допустимых концентраций вредных веществ в воде водоемов.

Таблица 3.4

**РАСЧЕТНЫЕ ФОРМУЛЫ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ РЕГЛАМЕНТИРОВАНИИ ВРЕДНЫХ ВЕЩЕСТВ
В ВОЗДУХЕ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ПОМЕЩЕНИЙ**

Формулы	N Формул
$\lg \frac{DL}{50} (в/в) = 0,61 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 1,48$	45
$\lg \frac{CL}{50} = 0,84 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 2,33$	46
$\lg \frac{CL}{50} = 1,15 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 2,97$	47
$\lg \lim_{ac} = 0,68 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 3,40$	48
$\lg \lim_{ac} = 0,91 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 0,80$	49
$\lg \lim_{ac} = 0,76 \lg \frac{CL}{50} - 1,62$	50
$\lg \lim_{ac} = 0,74 \lg \frac{CL}{50} - 0,48$	51
$\lg \lim_{ac} = 0,62 \lg \frac{CL}{50} - 1,08$	52
$\lg \lim_{chr} = 0,77 \lg \lim_{ac} - 0,56$	53
$\lg \frac{ОБУВ}{p.з} = 0,88 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) - 2,29$	54
$\lg \frac{ОБУВ}{p.з} = 0,892 \lg \lim_{ir} - 1,034$	55
$\lg \frac{ОБУВ}{p.з} = 0,69 \lg \frac{DL}{50} (в/ж) + 0,53 \lg \lim_{ac} - 2,6$	56
$\lg \frac{ОБУВ}{p.з} = 0,38 \lg \frac{CL}{50} + 0,55 \lg \lim_{ac} - 1,96$	57
$\lg \frac{ОБУВ}{p.з} = 0,22 \lg \frac{CL}{50} + 0,49 \lg \lim_{ac} + 0,41 \lg \frac{DL}{50}$	58

- 1,95	
$\text{ОБУВ} = \frac{M \times 1000}{\text{СИГМА } \sum_i 1}$	59

4. Рекомендуемые экспресс-экспериментальные методы

Экспресс-экспериментальные методы используются с целью ускоренного определения параметров хронической токсичности веществ на основе интегральной количественной оценки процессов развития интоксикации в краткосрочных опытах.

Для проведения экспресс-экспериментов рекомендуются следующие методические схемы.

Экспресс-эксперимент для расчета МНД по времени гибели животных основан на использовании корреляционной связи между одним из наиболее надежных показателей кумулятивных свойств веществ – DL_{50} /МНД и вероятностной величиной эpsilon T₅₀, характеризующей сроки гибели животных в остром опыте при дозе вещества, равной DL_{50} .

4.1. Для определения эpsilon T₅₀ составляется рабочая таблица, аналогичная таблице учета результатов острого опыта (сроки гибели животных выражаются в часах). По таблице подсчитывается суммарное время гибели всех животных от каждой из испытанных доз (t_c), из которых находится среднее время гибели одного животного (t₁) по формуле:

$$t_1 = \frac{t_c}{n},$$

где n – общее количество животных, погибших от данной дозы.

4.1.1. Для определения эpsilon T₅₀ строят прямоугольную систему координат (в логарифмическом масштабе), откладывая на оси абсцисс время гибели животных (в часах), а на оси ординат – использованные в опыте дозы вещества. На график наносятся точки, соответствующие ранее найденным значениям t₁, и через них проводится прямая, по которой находится эpsilon T₅₀ – время гибели животных, соответствующее DL_{50} .

4.1.3. Основываясь на установленной корреляционной зависимости

$$\lg \frac{DL_{50}}{\text{МНД}} = 1,302 \lg \text{эpsilon T}_{50} + 2,220,$$

рассчитывается величина МНД по формуле:

$$\lg \text{МНД} = 1,302 \lg \text{эpsilon T}_{50} + \lg DL_{50} - 2,220$$

(n = 24, r = 0,604, t = 3,04).

4.2. Экспресс-эксперимент для прогнозирования параметров хронической токсичности по начальным стадиям интоксикации.

4.2.1. В основу этого эксперимента положена схема (рис. 4.1), позволяющая оценить динамику развития начальной фазы токсикодинамического процесса и выявить зависимости между количественными характеристиками воздействия вещества в кратковременных и длительных (хронических) опытах.

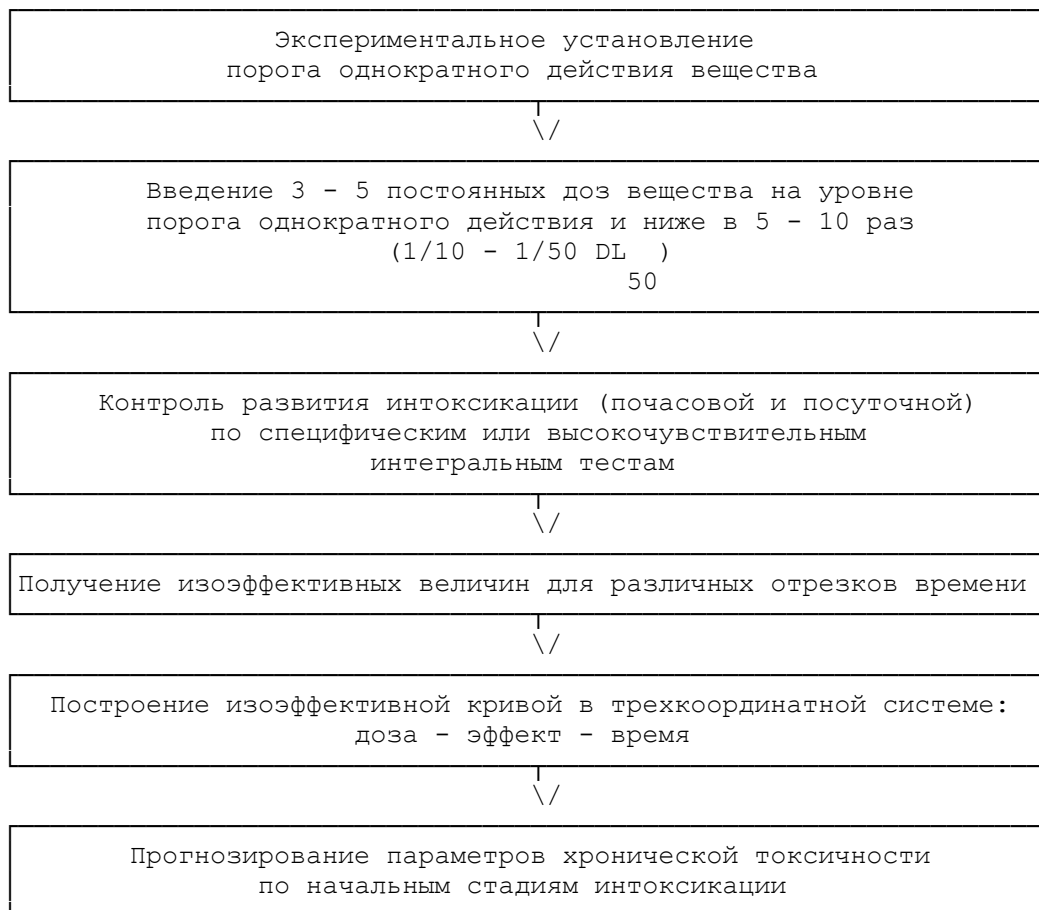


Рис. 4.1. Схема экспресс-эксперимента для прогнозирования параметров хронической токсичности по начальным стадиям интоксикации

4.2.2. Необходимым условием проведения эксперимента является соблюдение перечисленных ниже требований.

4.2.2.1. Исследуемое вещество должно применяться в постоянных дозах (в долях DL), выбираемых с таким расчетом, 50

чтобы при их ежедневном введении животным токсический эффект наблюдался в течение первых суток и практически исчезал перед повторным введением. Применение больших (близких к смертельному) доз нецелесообразно, так как в этом случае в интервале между двумя последовательными введениями вещества (24 часа) могут не развиваться в достаточной степени компенсаторные реакции, и изменившиеся функции организма не успеют вернуться к исходному

состоянию, что приведет к накладыванию эффектов повторного и предыдущего введения, имитирующему кумулятивность исследуемого соединения. Напротив, чрезмерно малые дозы могут не вызвать значимых изменений исследуемых функций в краткосрочном эксперименте, что потребует значительного увеличения его продолжительности.

4.2.2.2. В эксперименте следует использовать не менее трех доз веществ, одна из которых соответствует порогу однократного действия, выявляемому в предварительном опыте, а остальные определяются экспериментатором путем дробного снижения этой дозы (обычно в 5 - 10 раз).

4.2.2.3. С учетом существующих представлений о фазовости процессов первичной декомпенсации и компенсации в организме и с целью достаточно полного выявления токсикодинамики вещества общая длительность эксперимента должна составлять 20 - 30 суток.

4.2.2.4. Для оценки действия веществ при введении их в малых постоянных дозах следует использовать градуированные эффекты, т.е. учитывать изменения патогенетических показателей (соответствующих токсикодинамике веществ). Могут использоваться также высокочувствительные интегральные тесты, такие как:

- изучение высшей нервной деятельности;
- проба с бромсульфалеином;
- витальное окрашивание тканей;
- иммунологические методы (кожная микрофлора, заверченный фагоцитоз);
- изучение системы "гипофиз - кора надпочечников" (17-кетостероиды в моче, масса и объем надпочечников, содержание в них аскорбиновой кислоты и включение радиофосфора);
- исследование активности ключевых ферментов, в том числе проникающих в кровь при изменении проницаемости клеточных мембран тканей.

4.2.2.5. Контроль за развитием интоксикации должен осуществляться почасовой (1 - 3 - 6 - 12 - 24-й часы после введения вещества) и посуточный (на 1 - 5 - 10 - 15 - 20 - 30-е сутки наблюдения, начиная с 5-х суток) с учетом максимального изменения изучаемой функции в течение суток.

4.2.2.6. Результаты часовых и суточных определений изучающихся показателей должны быть выражены в виде среднеэффективных доз - вероятностных величин типа ϵD , с

расчетом стандартной ошибки методом пробит-анализа (Литчфилда и Уилкоксона). При выборе "уровня" эффективной дозы необходимо учитывать значимость изменений изучающихся показателей: для некоторых функций изменение их первоначального ("нормального") уровня на 50 - 60% может быть несовместимо с жизнью, поэтому при оценке таких функций следует ориентироваться на их пороговые сдвиги и выражать регистрируемые изменения в виде величин ϵD , ϵD , ϵD , ..., ϵD (m - степень изменения величины показателя в %).

4.2.2.7. Полученные изоэффективные величины ϵD для различных (суточных) периодов наблюдения ϵD , где n - число

суток от начала введения вещества, должны быть представлены в виде вероятностной изоэффективной кривой в трехкоординатной системе доза - эффект - время. Это позволяет оценить соотношение процессов полома функций и ответных адаптационных реакций организма и их фазовость, а также прогнозировать дальнейший ход интоксикации по изменениям, выявленным в ее начальной стадии.

4.2.2.8. Прогноз параметров хронической токсичности проводится на основе изоэффективной кривой (п. 4.2.2.7) путем графической экстраполяции величины эффекта вещества в начальной стадии интоксикации на отдаленные сроки. При этом следует учитывать, что наименьшая величина ϵD , полученная в 20 - 30-суточном

эксперименте, и аналогичная величина D_{50} на 6 - 10-м месяцах исследования различаются обычно не более чем в 10 раз, а отличия последней из этих величин от пороговой дозы в хроническом опыте (ПД) не превышают 5 раз.

4.3. Экспресс-метод оценки кумулятивных свойств.

4.3.1. В основе экспресс-метода лежит оценка кумулятивных свойств нормируемого вещества по периоду T полусуществования первичного кумулятивного эффекта (первичной токсикологической реакции) в органе, ответственном за развитие летального исхода (критическом органе). В случае материальной кумуляции T совпадает с периодом полусуществования в критическом органе самого вещества, в общем случае - является его аналогом. Формально $T = 0,693 / k$, где k - константа скорости исчезновения вещества.

4.3.2. С периодом T связано понятие о квоте элиминации Q (суточное выведение вещества в процентах к его содержанию, т.е. потеря действия вещества за сутки).

$$Q = 100 (1 - e^{-0,693/T})$$

Формально $Q = 100 (1 - e^{-0,693/T})$ %. Чем больше T , тем меньше Q и тем сильнее выражены кумулятивные свойства вещества. Классификация вещества по T (resp. по Q), соответствующая обычным 4 градациям кумулятивности веществ, приведена в табл. 4.1.

Таблица 4.1

КЛАССИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ПО T

Группа веществ	Степень кумуляции	T (сутки)	Q (%)
I-A	Очень сильная (сверхкумуляция)	> 3	≤ 10
I-B	Сильная	$1 < T \leq 3$	$\sim 20 - 30$
II-A	Средняя	~ 1	$\sim 40 - 60$
II-B	Слабая	< 1	≥ 70

4.3.3. Если механизм действия вещества известен, определение T формально ничем не отличается от определения периода полусуществования вещества. В противном случае практически приемлемые оценки T можно получить на основании учета гибели животных при различных условиях постановки опытов (так как факт гибели свидетельствует о поражении критического органа). С этой целью необходимо провести не менее двух опытов на белых крысах.

4.3.4. В опыте I проводится обычное определение DL_{50} при введении вещества (в/ж) с тем отличием, что DL_{50} нужно рассчитывать дважды:

1) по результатам гибели животных в течение 1-х суток после введения вещества (D_1);

2) по результатам гибели животных в течение всего периода наблюдения $<T>$, включая первые сутки (D_1). Для определения D_2 , кроме обычной схемы опыта, могут быть использованы методы одной или двух точек, а в ряде случаев, в зависимости от результатов определения D_1 , - простая запись, что превышает наибольшую из испытанных разовых доз (D_1). По полученным данным находят индекс

кумуляции $I = D_2 / D_1$, и по срокам гибели животных, получивших вещество в дозе, превышающей D_2 , рассчитают среднее время эpsilon T_{50} летального исхода.

<*> Необходимая длительность этого периода (в пределах 2 - 4 недель) определяется в каждом случае фактическими сроками гибели животных.

4.3.5. Опыт II аналогичен обычному подострому опыту с тем отличием, что группе животных (не менее 20 белых крыс) повторно вводится доза, равная $1/2 D_1$. Затравка проводится до гибели хотя бы 60% животных. Непосредственной целью опыта является определение среднего времени эpsilon $T_{50(n)}$ летального исхода. Результаты обоих опытов оценивают по представленной в табл. 4.2 шкале.

Таблица 4.2

ПАРАМЕТРЫ КУМУЛЯТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ
И МАКСИМАЛЬНЫЕ НЕДЕЙСТВУЮЩИЕ ДОЗЫ (МНД)

Группа веществ	I _к	50 (1), сутки	50 (1), сутки	МНД, мг/кг
I-А	$\geq 0,5$	> 1	< 5	$1/250000 D_2$
I-Б	$0 < I_k < 0,5$	≥ 1	< 5	$1/50000 D_2$
II-А	0	< 1	5 - 15	$1/10000 D_2$
II-Б	0	$< 1 - \ll 1$	> 15	$1/2000 D_2$

Если в опыте I определению поддается только доза D_2 или оказывается, что эpsilon $T_{50} \ll 1$ суток, можно принять $T_{50} \approx$ эpsilon T_{50} . Отсутствие гибели животных в этом опыте указывает на $T_{50} < 1$ суток. В этом случае целесообразно дополнительно определить DL_{50} при в/б введении вещества ($D_{в/б}$) и рассчитать $MND = 3/2000 D_{в/б}$ (поскольку $D_{в/б} = 0,32 D_2$). При иных затруднениях в использовании приведенной шкалы прибегают к проведению опытов III и IV. Если в опыте II найдено эpsilon $T_{50(n)} < 5$ суток, логичен переход к опыту III, при эpsilon $T_{50(n)} \approx 15$ суткам - к опыту IV.

4.3.6. Опыт III проводится при необходимости получить дополнительные данные для разграничения веществ, относящихся к группам I-А и I-Б. Он является продолжением опыта II и отличается от него тем, что разовая доза $D = 1/2 D_2$ вводится не ежедневно, а

с интервалом $\tau = 2; 3, \dots, m$ суток. Цель опыта III: увеличивая τ , найти такое значение этого интервала, при котором 50% животных погибнет после 5 - 15 введений. По окончании опыта рассчитывают $T = \tau \times n / \epsilon$, где n - среднее число введений в интервале $n = 5 - 15$. Значение n находят аналогично ϵ (при $\tau = 1$ суткам, n численно равно ϵ) и $T \approx \tau$.

4.3.7. Опыт IV проводится при необходимости получить дополнительные данные для разграничения веществ, относящихся к группам II-A и II-B. Используется методика Н. Рашевски с некоторыми изменениями. Группе белых крыс (не менее 20 животных) дважды с интервалом $\tau = \epsilon$ вводят дозу $D \approx 2/3 D_{16} - D_{30}$. Значение дозы D находят по спрямленной кривой летальности, полученной ранее в опыте I. Учитывают гибель животных (в процентах, затем в пробитах) в результате двукратного введения D . Соответственно найденному пробиту по той же кривой летальности определяют эффективную суммарную дозу D . Далее рассчитывают $T = 0,693 / k$, находят предварительно значение k из условия $e^{-kx} = D / D - 1$. Функция e^{-kx} затабулирована; в данном случае $x = k \tau$, и по табличному значению x легко найти k . Если вещество относится к группе II-B, точность оценки T в опыте IV существенно выше, чем по результатам опыта II. Во всех остальных случаях попытка рассчитать T приводит к абсурду. Последнее указывает, что исследуемое вещество нельзя отнести к группе II-B.

5. Нормирование веществ с учетом закономерностей гомологии и изомерии

5.1. При гигиеническом нормировании алифатических соединений рекомендуется учитывать следующие общие положения, позволяющие сократить объем исследований по обоснованию ПД и МНД и ускорить разработку ПДК веществ.

5.1.1. Стабильность легко растворимых в воде алифатических соединений нормального строения и их изомеров уменьшается с увеличением длины углеводородной цепи и степени ее разветвления. Поэтому для определения стабильности изомеров необходимо знать стабильность соответствующего углеводорода нормального строения. Для прогноза стабильности неизученного алифатического углеводорода нормального строения необходимо знать стабильность представителя ряда с 7 и 3 атомами углерода в молекуле. Первые два и четвертый члены нормальных гомологических рядов целесообразно изучать индивидуально.

5.1.2. Для прогноза пороговых концентраций в воде по запаху должен быть определен этот показатель для гомолога нормального строения с 7 атомами углерода. С уменьшением длины углеводородной цепи и ее разветвлением пороговые концентрации по запаху увеличиваются. Исключение могут составлять бутиловый и изоамиловый углеводороды.

Гомологи нормального строения с 8 и более атомами углевода сохраняют пороги запаха в воде на уровне C или выше, а их изомеры

имеют более низкие пороги запаха относительно соответствующих представителей нормального строения.

5.1.3. Для прогнозирования характера влияния углеводородов нормального строения и их изомеров на БПК воды можно ограничиться сведениями о любом гомологе данного ряда с числом углеводородных атомов более трех. Первые три члена отдельных гомологических рядов могут иметь индивидуальные отличия от общей закономерности. Для установления ориентировочного порога по влиянию гомолога на процессы БПК необходимо дополнительно определить этот показатель у гомолога нормального строения с 7 атомами углерода. Если углеводороды повышают БПК, то в ряду $C_3 - C_7$ их пороги сохраняются преимущественно на одном уровне, а у $C_1 - C_2$ и $C_8 - C_{10}$ увеличиваются. Если углеводороды тормозят БПК, то с увеличением длины углеводородной цепи пороговые концентрации имеют тенденцию к уменьшению.

5.1.4. Для определения параметров острой токсичности соединений изучаемого ряда необходимо знать величины DL_{50} нормальных гомологов с 3, 7 и 10 (или 9) атомами углерода. В гомологическом ряду углеводороды нормального строения с числом атомов углерода менее или более 7 будут иметь близкие или уменьшающиеся среднесмертельные дозы, которые будут располагаться в пределах прямых токсического эффекта, проведенных от C_7 к C_3 и C_{10} . Изомеры с разветвленной цепью и содержанием углеводородных атомов меньше 7, как правило, имеют более высокие среднесмертельные дозы. Изомеры с числом углеводородных атомов 8 - 9 - 10 и более, наоборот, токсичнее соответствующих углеводородов нормального строения. Алифатические соединения с 1 и 2 атомами углерода не имеют изомеров и нередко отличаются от общей закономерности токсического действия более выраженным своеобразием. Гомолог с четырьмя атомами углерода (нормального строения) может иметь несколько большую токсичность, вероятно, за счет более выраженного кумулятивного эффекта.

5.1.5. При одинаковых кумулятивных свойствах нормируемых гомологов в ряде случаев целесообразно МНД (ПД) определять у одного гомолога, а для остальных членов изучаемого ряда находить их расчетным путем (графически), используя тесную связь между МНД (ПД) и DL_{50} . С этой целью на ось абсцисс наносят порядковые номера изучаемых гомологов, а на ось ординат - логарифмы среднесмертельных доз соответствующих веществ и строят прямую, близкую к точкам показателей среднесмертельных эффектов. Затем на график наносится точка, соответствующая логарифму МНД изученного соединения, и через нее параллельно прямой среднесмертельных доз проводится новая прямая.

Следует учитывать, что в гомологических рядах монотонное изменение токсичности наблюдается лишь для определенного отрезка ряда. Поэтому для определения МНД (ПД) необходимо предварительно в острых опытах проверить изменение токсичности изучаемых гомологов; лишь при монотонном изменении токсичности можно проводить прямую МНД (ПД), параллельную прямой DL_{50} , не выходя за границы изученного отрезка.

Следует помнить, что указанный прием определения МНД (ПД) не учитывает специфических эффектов вещества.

5.1.6. Подпороговые дозы гомологов нормального строения при хроническом поступлении в организм с питьевой водой располагаются на графике преимущественно на прямой между $C_7 - C_3$ и $C_7 - C_{10}$.

Изомеры с разветвленной цепью от C₇ до C₃ будут иметь более высокие подпороговые дозы, а от C₇ до C₁₀ - низкие. Если гомологи C₃ или C₄ и C₇ имеют убедительно обоснованные подпороговые дозы, то при разработке ПДК промежуточных гомологов или их изомеров в ряду между C₇ и C₃ можно ограничиться изучением только отдаленных последствий хронической интоксикации.

Следует принимать во внимание, что в гомологическом ряду C₇ - C₁₀ с увеличением степени разветвления углеводородной цепи токсичность изомеров может возрастать. Это явление еще недостаточно изучено, и в таких случаях целесообразно проведение хронического эксперимента.

5.1.7. Лимитирующий признак вредности у гомологов нормального строения C₃ - C₇ преимущественно бывает одинаковым. Первые два члена гомологических рядов нормального строения требуют индивидуального изучения. У гомологов нормального строения с числом углеродных атомов ≥ 8 лимитирующий признак вредности может изменяться по сравнению с рядом C₃ - C₇. С разветвлением цепи соотношение между уровнем острой токсичности (DL₅₀) и подпороговой дозой при хроническом воздействии изомеров на организм будет увеличиваться.

Приложение 1

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, СИМВОЛОВ И СПЕЦИАЛЬНЫХ ТЕРМИНОВ

ПДК - предельно допустимая концентрация вещества в воде водных объектов, используемых для хозяйственно-питьевых и культурно-бытовых целей, устанавливаемая как максимально недействующая;

ПДК_р - то же для воды водных объектов, используемых для рыбохозяйственных целей;

ПДК_{а.в} - то же для атмосферного воздуха (среднесуточная);

ПДК_{р.з} - то же для воздуха рабочей зоны;

ПДК_{п.в. США} - допустимый уровень содержания вещества в питьевой воде по стандарту США;

TLV - величина порогового предела (норматив для регламентирования содержания вредных веществ в воздухе производственных помещений, принятый в США);

ОБУВ - ориентировочный безопасный уровень воздействия;

DL₅₀ - среднесмертельная доза при введении вещества в/ж, в/б или в/в;

СЛ - среднесмертельная концентрация при ингаляционном

воздействии вещества;

Lim_{ас} - порог острого (однократного) действия вещества для крыс при 4-часовом ингаляционном воздействии;

Lim_{chr} - порог хронического действия для подопытных животных при ингаляционном воздействии на протяжении 4 месяцев по 4 часа в день 5 раз в неделю;

Lim_{ir} - порог раздражающего действия для крыс при 4-часовой ингаляции по комплексу показателей (частота дыхания, прижизненная окраска тканей легких нейтральным красителем, "острота обоняния", клеточная реакция легких и верхних дыхательных путей);

ПК_{а.в} - пороговая концентрация хронического эффекта вещества при ингаляционном воздействии (по схеме гигиенического нормирования в атмосферном воздухе);

ПК_{орг} - пороговая концентрация по органолептическому признаку вредности;

ПК_{сан} - пороговая концентрация по общесанитарному признаку вредности;

ПД - пороговая доза хронического эффекта вещества при введении его в/ж (по схеме гигиенического нормирования в воде водных объектов);

ПД_{общ} - пороговая доза по общетоксическому эффекту;

ПД_{отд} - пороговая доза, установленная с учетом отдаленных токсических эффектов;

МНД - максимальная недеиствующая концентрация вещества в тех же условиях;

МНК - максимальная недеиствующая концентрация вещества в воде, определяемая как МНД x 20;

к_к - коэффициент кумуляции;

к_{в/ж} - введение внутривенно;

к_{в/в} - введение внутривенно;

к_{в/б} - введение внутрибрюшинно;

ОК - октановый коэффициент;

М - молекулярная масса;

альфа - растворимость в воде;

сигма - индукционный коэффициент Тафта;

D - величина дипольного момента;

х - величина диэлектрической проницаемости;

эпсилон - величина потенциала поляризации;

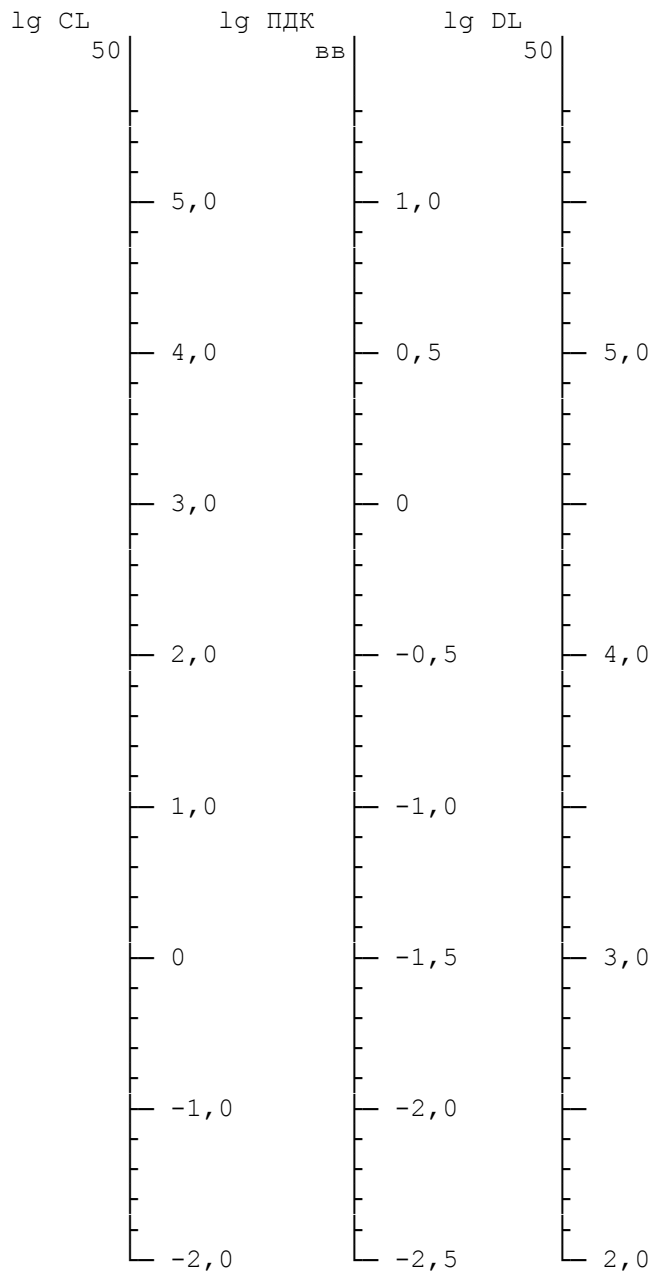
I - величина потенциала ионизации;

t_{пл} - температура плавления;

t_{кип} - температура кипения;

Р - процент олова в молекуле органического соединения.

НОМОГРАММА ДЛЯ ОРИЕНТИРОВОЧНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПДК
(С.Д. ЗАУГОЛЬНИКОВ И СОАВТ.)



Условные обозначения:

- lg CL - шкала логарифмов среднесмертельных концентраций;
50
- lg DL - шкала логарифмов среднесмертельных доз;
50
- lg ПДК - шкала логарифмов ПДК вещества в воде водоемов.
ВВ

**УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ ФОРМУЛ,
ПРИВЕДЕННЫХ В "МЕТОДИЧЕСКИХ УКАЗАНИЯХ"**

N формул	Авторы
1 - 5, 15, 20 - 27, 32 - 36, 43	Г.Н. Красовский, С.А. Шиган
13, 14, 16, 17, 30, 31	Г.Н. Красовский, Н.А. Егорова
6 - 12, 18, 19	С.И. Плитман
28, 29	В.Т. Мазаев
37 - 40, 44	С.Д. Заугольников с соавт.
41	Я.Н. Тарадин, А.С. Фаустов
42	А.А. Голубев, В.Г. Субботин
45, 47, 49, 56 - 58	С.М. Новиков
46, 48, 50, 54	Е.И. Люблина
51 - 53	К.К. Сидоров
59	Г.Н. Заева
60	Г.Н. Красовский, Э.И. Жолдакова, Н.А. Егорова