**Dette dokument er et dokumentationsredskab, og institutionerne påtager sig intet ansvar herfor**

►B

# KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 440/2008

**af 30. maj 2008**

**om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) Nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)**

**(EØS-relevant tekst)**

(EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1)

Ændret ved:

| | | Tidende | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nr. | side | dato |
| ►M1 | Kommissionens forordning (EF) nr. 761/2009 af 23. juli 2009 | L 220 | 1 | 24.8.2009 |
| ►M2 | Kommissionens forordning (EU) nr. 1152/2010 af 8. december 2010 | L 324 | 13 | 9.12.2010 |
| ►M3 | Kommissionens forordning (EU) nr. 640/2012 af 6. juli 2012 | L 193 | 1 | 20.7.2012 |
| ►M4 | Kommissionens forordning (EU) nr. 260/2014 af 24. januar 2014 | L 81 | 1 | 19.3.2014 |

▼B

# KOMMISSIONENS FORORDNING (EF) Nr. 440/2008

**af 30. maj 2008**

**om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) Nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)**

**(EØS-relevant tekst)**

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF [1], særlig artikel 13, stk. 3, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) I henhold til forordning (EF) nr. 1907/2006 skal der på EU-plan fastlægges forsøgsmetoder til undersøgelse af stoffer, hvis forsøg er påkrævet til fremskaffelse af oplysninger om stoffers iboende egenskaber.

(2) I Rådets direktiv 67/548/EØF af 27. juni 1967 om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer [2] indeholder bilag V metoderne til bestemmelse af stoffers og præparaters fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet. Ved direktiv 2006/121/EF er bilag V til direktiv 67/548/EØF udgået med virkning fra den 1. juni 2008.

(3) Forsøgsmetoderne i bilag V til direktiv 67/548/EØF bør indarbejdes i denne forordning.

(4) Denne forordning udelukker ikke, at der anvendes andre testmetoder, når blot deres anvendelse er i overensstemmelse med artikel 13, stk. 3, i forordning 1907/2006.

---

[1] EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1. Berigtiget i EUT L 136 af 29.5.2007, s. 3.

[2] EFT 196 af 16.8.1967, s. 1. Senest ændret ved Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2006/121/EF (EUT L 396 af 30.12.2006, s. 850. Berigtiget i EUT L 136 af 29.5.2007, s. 281) — *denne henvisning ajourføres, når 30. tilpasning til den tekniske udvikling er offentliggjort.*

▼B

(5) Ved udformningen af forsøgsmetoderne bør der i fuldt omfang tages hensyn til principperne om at erstatte, begrænse og raffinere brugen af dyr i procedurer, især når der bliver rådighed over validerede metoder, som kan erstatte, begrænse eller raffinere dyreforsøg.

(6) De i denne forordning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er nedsat ved artikel 133 i forordning (EØF) nr. 1907/2006 —

UDSTEDT FØLGENDE FORORDNING:

*Artikel 1*

De forsøgsmetoder, der skal anvendes i forbindelse med forordning (EF) nr. 1907/2006, er fastlagt i bilaget til nærværende forordning.

*Artikel 2*

Kommissionen revurderer efter behov forsøgsmetoderne i denne forordning med henblik på at erstatte, begrænse eller raffinere forsøg med hvirveldyr.

*Artikel 3*

Alle henvisninger til bilag V til direktiv 67/548/EØF skal betragtes som henvisninger til nærværende forordning.

*Artikel 4*

Denne forordning træder i kraft dagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Den anvendes fra den 1. juni 2008.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

▼B

*BILAG*

**DEL A: METODER TIL BESTEMMELSE AF FYSISK/KEMISKE EGENSKABER**

INDHOLDSFORTEGNELSE


A.1. Smelte-/frysepunkt

A.2. Kogepunkt

A.3. Relativ massefylde

A.4. Damptryk

A.5. Overfladespænding

A.6. Vandopløselighed

A.8. Fordelingskoefficient

A.9. Flammepunkt

A.10. Antændelighed (faste stoffer)

A.11. Antændelighed (gasser)

A.12. Antændelighed (kontakt med vand)

A.13. Væskers og faste stoffers pyroforiske egenskaber

A.14. Eksplosive egenskaber

A.15. Selvantændelsestemperatur for væsker og gasser

A.16. Relativ selvantændelsestemperatur for faste stoffer

A.17. Oxiderende egenskaber (faste stoffer)

A.18. Polymerers antalsmiddelmolekylvægt og molekylvægtsfordeling

A.19. Polymerers indhold af lavmolekylære bestanddele

A.20. Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vand

A.21. Oxiderende egenskaber (væsker)

A.22. Fibres længdevægtede geometriske middeldiameter

▼M4

A.23. Fordelingskoefficient (1-octanol/vand): slow-stirring-metoden

▼B

A.1. **SMELTE-/FRYSEPUNKT**

1. **METODE**

De fleste af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2) og (3).

1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uanset renheden.

De beskrevne metoder og apparater kan anvendes til bestemmelse af smeltepunktet for kemiske stoffer uanset renheden. Valg af metode afhænger af arten af det stof, der skal undersøges. Det er således afgørende, om stoffet let, vanskeligt eller slet ikke kan pulveriseres.

For nogle stoffer er bestemmelse af fryse- eller størkningspunkt mere hensigtsmæssigt, og der er i denne metode medtaget standarder for sådanne bestemmelser.

Hvis det som følge af stoffets særlige egenskaber er umuligt at bestemme nogen af ovenstående parametre, kan det være hensigtsmæssigt at bestemme et flydepunkt.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Smeltepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken faseovergangen fra fast til flydende tilstand finder sted ved atmosfæretryk, og denne temperatur svarer i det ideale tilfælde til temperaturen ved frysepunktet.

Da faseovergangen for mange stoffer finder sted over et temperaturinterval, beskrives den ofte som smeltepunktsintervallet.

Enhedsomregning (K til $^{o}$C)

$t = T - 273{,}15$

t: er temperaturen i grader celsius ( $^{o}$C)

T: er temperaturen i kelvin (K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest bruges til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i henvisningerne (4) angivet nogle referencestoffer.

▼B

1.4. METODENS PRINCIP

Temperaturen (temperaturintervallet) for faseovergangen fra fast til flydende tilstand eller fra flydende til fast tilstand bestemmes. I praksis bestemmes temperaturen ved begyndende smeltning/frysning og ved endelig smeltning/frysning under opvarmning/afkøling af en prøve af stoffet ved atmosfæretryk. Der er beskrevet fem typer metoder: kapillarmetoder, varmebordsmetoder, frysepunktsbestemmelser, termoanalyse og flydepunktsbestemmelse (som udviklet til mineralolier).

Det kan i nogle tilfælde være mere hensigtsmæssigt at bestemme frysepunktet end smeltepunktet.

1.4.1. **Kapillarmetode**

1.4.1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

En lille mængde af det findelte stof fyldes i et kapillarrør og pakkes tæt. Røret opvarmes sammen med et termometer, og temperaturstigningen indstilles til mindre end ca. 1 K/min under den egentlige smeltning. Temperaturen ved begyndende og endelig smeltning bestemmes.

1.4.1.2. *Smeltepunktsapparater med metalblok*

Som beskrevet under 1.4.1.1 bortset fra, at kapillarrøret og termometeret er anbragt i en opvarmet metalblok og kan iagttages gennem huller i blokken.

1.4.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

Prøven i kapillarrøret opvarmes automatisk i en metalcylinder. En lysstråle sendes via et hul i cylinderen gennem stoffet og ind på en nøjagtigt indstillet fotocelle. De fleste stoffers optiske egenskaber ændres under smeltning fra at være uigennemsigtige til gennemsigtige. Derved øges den lysmængde, som når frem til fotocellen, og der sendes et stopsignal til en digitalindikator, som viser temperaturen af et platinmodstandstermometer anbragt i varmekammeret. Denne metode kan ikke anvendes for visse stærkt farvede stoffer.

1.4.2. **Varmeborde**

1.4.2.1. *Koflers varmebænk*

Koflers varmebænk består af to elektrisk opvarmede metalstykker med forskellig varmeledningsevne og er udformet sådan, at dens temperaturgradient i længderetningen er næsten lineær. Varmebænken kan spænde over temperaturområdet fra 283 K til 573 K og er forsynet med en særlig anordning til temperaturaflæsning, som består af en skyder med en viser, og en fane, og som er særligt udformet til den enkelte bænk. Smeltepunktet bestemmes ved, at det pågældende stof lægges i et tyndt lag direkte på bænkens overflade, hvorefter der på få sekunder opstår en skarp skillelinje mellem flydende og fast fase. Temperaturen på skillelinjen aflæses ved at indstille viseren på denne.

▼B

1.4.2.2. *Smeltemikroskop*

Der anvendes en række varmeborde med mikroskop til smeltepunktsbestemmelser på meget små stofmængder. I de fleste varmeborde måles temperaturen med et følsomt termoelement, men undertiden anvendes også kviksølvtermometre. Et typisk smeltepunktsapparat, bestående af varmebord med mikroskop, er udstyret med et varmekammer indeholdende en metalplade, hvorpå prøven anbringes i en slæde. I midten af metalpladen er der et hul, hvorigennem der kan sendes lys fra mikroskopets belysningsspejl. Når apparatet er i brug, er kammeret lukket med en glasplade for at forhindre luftens adgang til prøven.

Opvarmningen af prøven reguleres med en rheostat. Kræves meget nøjagtige målinger kan der for optisk anisotrope stoffer anvendes polariseret lys.

1.4.2.3. *Meniskmetoden*

Denne metode anvendes kun for polyamider.

Den temperatur, ved hvilken forskydningen af en silikonoliemenisk, som er indesluttet mellem et varmebord og et dækglas hvilende på polyamid-prøveemnet, iagttages visuelt.

1.4.3. **Metode til bestemmelse af frysepunkt**

Prøven anbringes i en særlig type reagensglas og anbringes i et apparat til bestemmelse af frysepunkt. Prøven afkøles under stadig langsom omrøring, og temperaturen måles med passende mellemrum. Når temperaturen er konstant ved flere aflæsninger, anføres denne temperatur (korrigeret for termometerfejl) som frysepunktet.

Underafkøling skal undgås ved, at der opretholdes ligevægt mellem den faste fase og væskefasen.

1.4.4. **Termoanalyse**

1.4.4.1. *Differential termoanalyse (DTA)*

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

▼B

1.4.4.2. *Differential scanning kalorimetri (DSC)*

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm (smeltning) eller exoterm (frysning) afvigelse fra den registrerede grundlinje.

1.4.5. **Flydepunkt**

Denne metode er udviklet til mineralolier og er egnet til olieagtige stoffer med lavt smeltepunkt.

Efter først at være opvarmet afkøles prøven med en bestemt hastighed, og dens flydeegenskaber undersøges med 3 K's mellemrum. Den laveste temperatur, ved hvilken der kan iagttages bevægelse i stoffet, registreres som flydepunktet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af smeltepunkt/smeltepunktsinterval er angivet i følgende tabel:

TABEL: METODERNES ANVENDELIGHED

A. **Kapillarmetoder**

| Målemetode | For stoffer, som kan pulveriseres | For stoffer, som ikke let pulveriseres | Temperaturområde | Skønnet ([1]) nøjagtighed | Foreliggende standard |
|---|---|---|---|---|---|
| Smeltepunktsapparater med væskebad | ja | enkelte | 273 til 573 K | ± 0,3 K | JIS K 0064 |
| Smeltepunktsapparater med metalblok | ja | enkelte | 293 til > 573 K | ± 0,5 K | ISO 1218 (E) |
| Bestemmelse med fotocelle | ja | adskillige ved hjælp af særligt udsryr | 253 til 573 K | ± 0,5 K | |

([1]) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

▼B

B. **Varmeborde og frysemetoder**

| Målemetode | For stoffer, som kan pulveriseres | For stoffer, som ikke let pulveriseres | Temperaturområde | Skønnet (1) nøjagtigned | Foreliggende standard |
|---|---|---|---|---|---|
| Koflers varmebænk | ja | nej | 283 K til > 573 K | ± 1,0 K | ANSI/ASTM D 345176 |
| Smekemikroskop | ja | enkelte | 273 K til > 573 K | ± 0,5 K | DIN 53736 |
| Meniskmetode | nej | kun for polyamider | 293 K til > 573 K | ± 0,5 K | IS0 1218 (E) |
| Frysepunktsmetoder | ja | ja | 223 K til 573 K | ± 0,5 K | f.eks. BS 4695 |

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

C. **Termoanalyse**

| Målemetode | For stoffer, som kan pulveriseres | For stoffer, som ikke let pulveriseres | Temperaturområde | Skønnet (1) nøjagtighed | Foreliggende standard |
|---|---|---|---|---|---|
| Differential termoanalyse | ja | ja | 173 K til 1 273 K | op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K | ASTM E 537-76 |
| Differential scanning kalorimetri | ja | ja | 173 K til 1 273 K | op til 600 K ± 0,5 K op til 1 273 K ± 2,0 K | ASTM E 537-76 |

(1) Afhxngig af instrumenttype og stoffets renhed.

D. **Flydepunkt**

| Målemetode | For stoffer, som kan pulveriseres | For stoffer, som ikke let pulveriseres | Temperaturområde | Skønnet (1) nø-jagtighcd | Foreliggende standard |
|---|---|---|---|---|---|
| Flydepunkt | for mineralolier og olieagtige stoffer | for mineralolier og olieagtige stoffer | 223 K til 323 K | ± 0,3 K | ASTM D 97-66 |

(1) Afhængig af instrumenttype og stoffets renhed.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

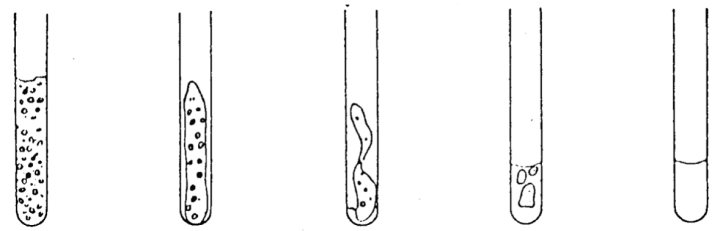
Fremgangsmåden er for næsten alle undersøgelsesmetoderne beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillægget).

1.6.1. **Kapillarrørsmetoder**

Fint pulveriserede stoffer udviser ved langsom opvarmning sædvanligvis et smeltningsforløb som vist på figur 1.

▼B

*Figur 1*



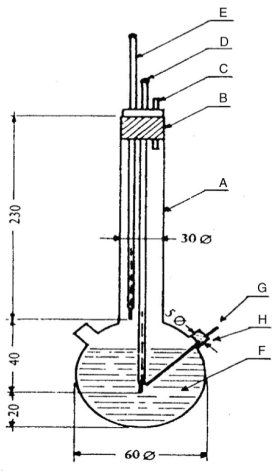

| | |
|---|---|
| Trin A | (begyndende smeltning): Små dråber fordeler sig jævnt over kapillarrørets indervæg. |
| Trin B | Der opstår et mellemrum mellem prøven og indervæggen som følge af prøvens skrumpning under smeltningen. |
| Trin C | Den indskrumpne prøve begynder at synke ned på bunden og blive flydende. |
| Trin D | Der dannes en ubrudt væskeoverflade, men en væsentlig del af prøven består stadig af fast stof. |
| Trin E | (endelig smeltning): Der er ingen faste partikler. |

Under smeltepunktsbestemmelsen noteres temperaturerne ved begyndende og endelig smeltning.

1.6.1.1. *Smeltepunktsapparater med væskebad*

Figur 2 viser en type standardiseret smeltepunktsapparat (JIS K 0064). Apparatet er fremstillet af glas, og alle mål er angivet i mm.

*Figur 2*




A: Målebeholder
B: Prop
C: Udluftningshul
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Kapillarrør af glas; længde 80-100 mm; indre diameter 1,0 ± 0,2 mm; vægtykkelse 0,2-0,3 mm
H: Siderør

▼B

*Badvæske:*

Der vælges en passende væske. Valget afhænger af, hvor højt et smeltepunkt der skal bestemmes, f.eks. paraffinolie for smeltepunkter op til 473 K og silikonolie for smeltepunkter op til 573 K.

For smeltepunkter over 523 K kan der anvendes en blanding af 3 dele svovlsyre og 2 dele kaliumsulfat (masseforhold). Anvendes denne blanding, skal der træffes passende sikkerhedsforholdsregler.

*Termometer:*

Man bør kun anvende termometre, som opfylder kravene i de følgende eller tilsvarende standarder:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Fremgangsmåde:*

Det tørre stof pulveriseres fint i en morter og fyldes i kapillarrøret, som er lukket i den ene ende, således at fyldningshøjden er ca. 3 mm efter tæt pakning. For at opnå en ensartet pakket prøve lader man kapillarrøret falde fra en højde af ca. 700 mm gennem et lodret glasrør ned på et urglas.

Det fyldte kapillarrør anbringes i badet, således at den midterste del af termometerets kviksølvbeholder berører den del af kapillarrøret, som prøven befinder sig i. Sædvanligvis anbringes kapillarrøret i apparatet, når badets temperatur er ca. 10 K under smeltepunktet.

Badvæsken opvarmes med en temperaturstigning på ca. 3 K/min under omrøring af væsken. Når temperaturen er ca. 10 K under det forventede smeltepunkt, indstilles temperaturstigningen til højst 1 K/min.

*Beregning:*

Smeltepunktet beregnes således:

$T = T_D + 0{,}00016\ (T_D - T_E)\ n$

hvor:

T = korrigeret smeltepunktstemperatur i K

$T_D$ = temperaturaflæsning af termometer D i K

$T_E$ = temperaturaflæsning af termometer E i K

n = antallet af gradinddelinger på den udestående del af termometer D's kviksøjle.

1.6.1.2. *Smeltepunktapparatar med metalblok*

*Apparat:*

*Dette består af:*

— en cylindrisk metalblok, hvis øverste del er hul og danner et kammer (se figur 3)

— en metalprop med to eller flere huller, som muliggør anbringelse af rør i metalklodsen

▼B

— et opvarmningssystem for metalklodsen, f.eks. i form af en elektrisk modstand indbygget i blokken

— en rheostat til regulering af energitilførslen, hvis der anvendes elektrisk opvarmning

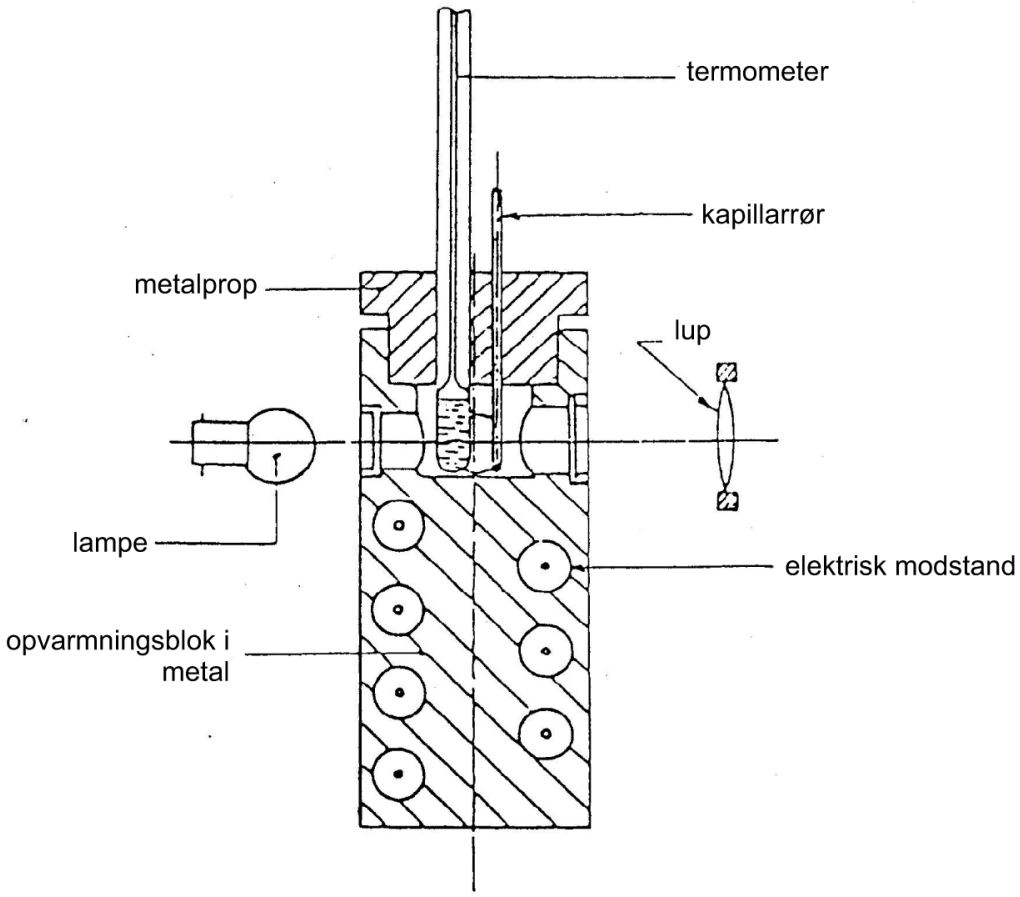
— fire vinduer af varmeresistent glas i kammerets sidevægge, anbragt diametralt og vinkelret på hinanden. Foran et af disse vinduer er der anbragt en lup til iagttagelse af kapillarrøret. De tre andre vinduer tjener til belysning af indersiden af kammeret ved hjælp af lamper

— et kapillarrør af varmeresistent glas lukket i den ene ende (se 1.6.1.1).

*Termometer:*

Se standarderne i 1.6.1.1. Termoelektriske måleinstrumenter med tilsvarende nøjagtighed kan også anvendes.

*Figur 3*




1.6.1.3. *Bestemmelse med fotocelle*

*Apparat og fremgangsmåde:*

Apparatet består af et metalkammer med et automatisk opvarmningssystem. Tre kapillarrør fyldes som i 1.6.1.1 og anbringes i ovnen.

▼B

Der er mulighed for flere lineære temperaturstigninger til kalibrering af apparatet, og temperaturstigningen indstilles elektrisk til en passende forudvalgt konstant og lineær hastighed. Skrivere viser den øjeblikkelige ovntemperatur og temperaturen af stoffet i kapillarrørene.

1.6.2. **Varmeborde**

1.6.2.1. *Koflers varmebænk*

Se tillæg.

1.6.2.2. *Smeltemikroskop*

Se tillæg.

1.6.2.3. *Meniskmetode (polyamider)*

Se tillæg.

Opvarmingshastigheden ved smeltepunktet skal være mindre end 1 K/min.

1.6.3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

Se tillæg.

1.6.4. **Termoanalyse**

1.6.4.1. *Differential termoanalyse*

Se tillæg.

1.6.4.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg.

1.6.5. **Bestemmelse af flydepunkt**

Se tillæg.

2. **DATA**

I visse tilfælde er termometerkorrektion nødvendig.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuelt indledende oprensningstrin

— den skønnede nøjagtighed.

Som smeltepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabellerne).

▼B

Hvis forskellen mellem temperaturen ved begyndende og endelig smeltning ligger inden for metodens nøjagtighed, angives temperaturen ved den endelige smeltning som smeltepunktet; i modsat fald angives begge temperaturer.

Hvis stoffet dekomponerer eller sublimerer, inden smeltepunktet er nået, anføres den temperatur, hvor dette fænomen er iagttaget.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

*Tillæg*

*Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder.*

1. **Kapillarmetoder**

1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad

| | |
|---|---|
| ASTM E 324-69 | Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals |
| BS 4634 | Method for the determination of melting point and/or melting range |
| DIN 53181 | Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapilarverfarehn |
| JIS K 00-64 | Testing methods for melting point of chemical products. |

1.2. Smeltepunktsapparater med metalblok

| | |
|---|---|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen |
| ISO 1218 (E) | Plastics — polyamides — determination of »melting point« |

2. **Varmeborde**

2.1. Koflers varmebænk

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM D 3451-76 | Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings |

2.2. Smeltemikroskop

| | |
|---|---|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen. |

2.3. Meniskmetode (polyamider)

| | |
|---|---|
| ISO 1218 (E) | Plastics — polyamides — determination of »melting point« |

▼B

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM D 2133-66 | Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials |
| NF T 51-050 | Resines de polyamides. Determination du »point de fusion« methode du menisque |

3. **Metoder til bestemmelse af frysepunkt**

| | |
|---|---|
| BS 4633 | Method for the determination of crystallizing point |
| BS 4695 | Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve) |
| DIN 51421 | Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen |
| ISO 2207 | Cires de petrole: determination de la temperature de figeage |
| DIN 53175 | Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren |
| NF T 60-114 | Point de fusion des paraffines |
| NF T 20-051 | Methode de determination du point de cristallisation (point de Congelation |
| ISO 1392 | Method for the determination of the freezing point |

4. **Termoanalyse**

4.1. Differential termoanalyse

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |

▼B

| | |
|---|---|
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

4.2. Differential scanning kalorimetri

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

5. **Bestemmelse af flydepunkt**

| | |
|---|---|
| NBN 52014 | Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'ecoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt |
| ASTM D 97-66 | Standard test method for pour point of petroleum oils |
| ISO 3016 | Petroleum oils — Determination of pour point |

▼B

## A.2. KOGEPUNKT

### 1. METODE

Flertallet af de beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2) og (3).

### 1.1. INDLEDNING

De her beskrevne metoder kan anvendes for alle væsker og lavtsmeltende stoffer, forudsat at der ikke indtræder nogen kemisk reaktion under kogepunktet (f.eks. autooxidation, omlejring eller nedbrydning). Metoderne kan anvendes for alle væsker uanset renheden.

De metoder, hvor der benyttes bestemmelse med fotocelle, og de, der er baseret på termoanalyse, fremhæves specielt, da de kan benyttes til bestemmelse af både smelte- og kogepunkt. Desuden kan disse målinger udføres automatisk.

Den dynamiske metode har den fordel, at den også kan benyttes til bestemmelse af damptryk, og det er ikke nødvendigt at korrigere kogepunktstemperaturen til standardtryk (101,325 kPa), da standardtrykket kan indstilles med en pressostat under målingen.

*Bemærkninger:*

Urenheders indflydelse på kogepunktsbestemmelsen afhænger stærkt af deres art. Hvis der i prøven er flygtige urenheder, som vil kunne få indflydelse på resultaterne, kan stoffet eventuelt renses.

### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Standardkogepunktet defineres som den temperatur, ved hvilken en væskes damptryk er 101,325 kPa.

Måles kogepunktet ikke ved standardatmosfæretryk, kan damptrykkets afhængighed af temperaturen beskrives ved Clausius-Clapeyrons ligning:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2,3\ RT} + \text{konstant}$$

hvor:

P = stoffets damptryk i pascal

$\Delta H_v$ = stoffets fordampningsvarme i J $mol^{-1}$

R = gaskonstanten = 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

T = den absolutte temperatur i K

Kogepunktet opgives i forhold til det aktuelle tryk under målingen.

▼B

*Omregninger*

Tryk (enhed kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(»bar« er stadig tilladt, men anbefales ikke)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(enhederne »mm Hg« og »Torr« er ikke tilladt).

1 atm = standardatmosfære = 101 325 Pa

(»atm«-enheden er ikke tilladt).

Temperatur (enhed: K)

$t = T - 273{,}15$

t: er temperaturen i grader celsius ( $^{o}C$)

T: er termodynamisk temperaturen i kelvin (K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Der er i de metoder, der er anført i tillægget, angivet nogle referencestoffer.

1.4. METODENS PRINCIP

Der er fem metoder til bestemmelse af kogepunkt (kogepunktsinterval), som er baseret på måling af den temperatur, ved hvilken prøven koger, og to metoder baseret på termoanalyse.

1.4.1. **Bestemmelse ved hjælp af ebulliometer**

Ebullitometre blev oprindeligt udviklet til molekylvægtsbestemmelse via kogepunktsforhøjelse, men de er også velegnede til nøjagtige kogepunktsbestemmelser. Et meget enkelt apparat er beskrevet i ASTM D 1120-72 (se tillæg). I dette apparat opvarmes væsken under ligevægtsbetingelser ved atmosfæretryk, indtil den koger.

1.4.2. **Dynamisk metode**

Ved denne metode måles dampens fortætningstemperatur ved hjælp af et egnet termometer anbragt i tilbagesvaleren under kogning. Trykket kan varieres ved denne metode.

1.4.3. **Destillationsmetode til bestemmelse af kogepunkt**

Ved denne metode destilleres væsken, og dampens fortætningstemperatur samt destillatmængden måles.

▼B

1.4.4. **Siwoloboffs metode**

En prøve opvarmes i et prøverør, som er nedsænket i et varmebad. Et tilsmeltet kapillarrør med en luftboble i den nederste ende er nedsænket i prøverøret.

1.4.5. **Bestemmelse med fotocelle**

Der foretages automatisk fotoelektrisk måling af opstigende bobler under anvendelse af Siwoloboffs princip.

1.4.6. **Differential termoanalyse**

Ved denne metode registreres temperaturforskellen mellem stoffet og et referencemateriale som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.4.7. **Differential scanning kalorimetri**

Ved denne metode registreres forskellen i den energimængde, der tilføres stoffet og et referencemateriale, som funktion af temperaturen, imedens stoffet og referencematerialet følger samme temperaturprogram. Denne forskel svarer til den energimængde, der er nødvendig for at opretholde en temperaturforskel på nul mellem stoffet og referencematerialet. En faseovergang i stoffet ledsaget af en enthalpiændring viser sig ved en endoterm afvigelse (kogning) fra den registrerede grundlinje.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendelighed og nøjagtighed for de forskellige metoder til bestemmelse af kogepunkt/kogepunktsinterval er angivet i tabel 1.

*Tabel 1*

**Sammenligning af metoderne**

| Målemetode | Skønnet nøjagtighed | Foreliggende standard |
|---|---|---|
| Ebulliometer | ± 1,4 K (op ril 373 K) (1) (2)<br>± 2,5 K (op til 600 K) (1) (2) | ASTM D 1120-72 (1) |
| Dynamisk metode | ± 0,5 K (op til 600 K) (2) | |
| Destillationsforløb (kogepunktsinterval) | ± 0,5 K (op til 600 K) | ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71 |
| Siwoloboff's metode | ± 2 K (op til 600 K) (2) | |
| Bestemmelse med fotocelle | ± 0,3 K (ved 373 K) (2) | |
| Differential termoanalyse | ± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K) | ASTM E 537-76 |
| Differential scanning kalorimetri | ± 0,5 K (op til 600 K) ± 2,0 K (op til 1 273 K) | ASTM E 537-76 |

(1) Denne nøjagtighed gælder kun for det simple apparat, som er beskrevet i f.eks. ASTM D 1120-72, den kan forbedres med mere raffinerede ebulliometre.
(2) Gælder kun for rene stoffer. Anvendelse under andre betingelser skal begrundes.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Nogle af metodernes fremgangsmåder er beskrevet i internationale og nationale standarder (se tillæg).

1.6.1. **Ebulliometer**

Se tillæg.

1.6.2. **Dynamisk metode**

Se metode A.4 til bestemmelse af damptryk.

Den kogetemperatur, der iagttages ved et tryk på 101,325 kPa, noteres.

1.6.3. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

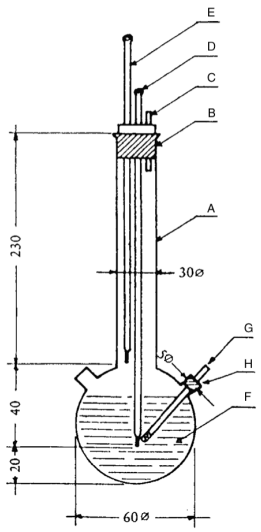
Se tillæg.

1.6.4. **Siwoloboffs metode**

Prøven opvarmes i et smeltepunktsapparat i et prøverør med en diameter på ca. 5 mm (figur 1).

Figur 1 viser en model af et standardiseret smelte- og kogepunktsapparat (JIS K 0064) (fremstillet af glas, alle mål i millimeter).

*Figur 1*



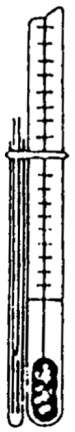

A: Målebeholder
B: Prop
C: Udluftning
D: Termometer
E: Hjælpetermometer
F: Badvæske
G: Prøverør, ydre diameter maks. 5 mm, med ca. 100 mm langt kapillarrør med indre diameter maks. 1 mm og vægtykkelse ca. 0,2-0,3 mm
H: Siderør

Et kapillarrør, som er tilsmeltet ca. 1 cm over den nederste ende, anbringes i prøverøret. Der fyldes så meget prøve i, at den tilsmeltede del af kapillarrøret befinder sig under væskeoverfladen. Prøverøret med kapillarrøret fastgøres til termometeret med en elastik eller fastholdes støttet fra siden (se figur 2).

▼B

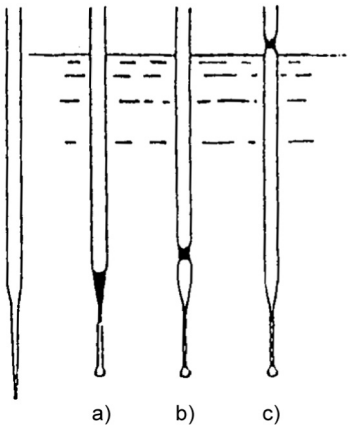
*Figur 2*

**Siwoloboff's princip**



*Figur 3*

**Modificeret princip**




Badvæsken vælges under hensyntagen til kogepunktet. Ved en temperatur på op til 573 K kan der benyttes silikonolie. Flydende paraffin må kun anvendes op til 473 K. Badvæsken opvarmes først med en hastighed på 3 K pr. minut under omrøring. Ca. 10 K under det forventede kogepunkt sænkes varmetilførslen, så temperaturstigningen bliver mindre end 1 K pr. minut. Når temperaturen nærmer sig kogepunktet, begynder der at strømme bobler ud af kapillarrøret.

Kogepunktet er den temperatur, hvor boblestrømmen under et kortvarigt temperaturfald standser og væsken begynder at stige op i kapillarrøret. Termometeraflæsningen viser stoffets kogepunkt.

I det modificerede princip (figur 3) bestemmes kogepunktet i et smeltepunktskapillarrør. Det trækkes ud til en ca. 2 cm lang tynd spids (a), og en smule af prøven suges op heri. Den åbne ende af det tynde kapillarrør tilsmeltes, så der dannes en lille luftboble ved enden. Ved opvarmning i smeltepunktsapparatet (b) udvider luftboblen sig. Kogepunktet ligger ved den temperatur, hvor stofproppen når op i højde med badvæskens overflade (c).

1.6.5. **Bestemmelse med fotocelle**

Prøven opvarmes i et kapillarrør i en opvarmet metalblok.

Via passende huller i blokken sendes der en lysstråle gennem stoffet ind til en nøjagtigt kalibreret fotocelle.

Medens temperaturen i prøven stiger, undviger der enkelte bobler fra kapillarrøret. Når kogepunktet er nået, vokser antallet af bobler voldsomt. Herved ændres intensiteten af det lys, som fotocellen modtager, så der sendes et stopsignal til den indikator, der viser temperaturen af et platinmodstandstermometer, der er anbragt i blokken

Denne metode er særlig anvendelig, da den kan benyttes til bestemmelser under stuetemperatur ned til 253,15 K (– 20 °C) uden ændringer ved apparaturet. Instrumentet skal blot anbringes i et kuldebad.

▼B

1.6.6. **Termoanalyse**

1.6.6.1. *Differential termoanalyse*

Se tillæg.

1.6.6.2. *Differential scanning kalorimetri*

Se tillæg.

2. **DATA**

Ved små afvigelser fra standardtryk (maks. ± 5 kPa) korrigeres kogepunktstemperaturerne ved hjælp af Sidney-Youngs ligning:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

hvor

$\Delta p$ = (101,325 – p) [bemærk fortegnet]

p = trykket målt i kPa

$f_T$ = kopepunktets ændring med trykker i K/kPa

T = målt kogepunkt i K

$T_n$ = kogepunkt i K, korrigeret til standardtryk

I ovennævnte nationale og internationale standarder findes der temperaturkorrektionsfaktorer $f_T$ for mange stoffer og udtryk til tilnærmelse af dem.

Eksempelvis anføres i DIN 53171 følgende grove korrektioner for opløsningsmidler i maling:

*Tabel 2*

**Temperaturkorrektionsfaktorer $f_T$**

| Temperatur T | korrektionsfaktor $f_T$ (K/kPa) |
|---|---|
| 323,15 | 0,26 |
| 348,15 | 0,28 |
| 373,15 | 0,31 |
| 398,15 | 0,33 |
| 423,15 | 0,35 |
| 448,15 | 0,37 |
| 473,15 | 0,39 |
| 498,15 | 0,41 |
| 523,15 | 0,44 |
| 548,15 | 0,45 |
| 573,15 | 0,47 |

▼B

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder) og eventuel indledende rensning

— den skønnede nøjagtighed.

Som kogepunkt anføres gennemsnittet af mindst to målinger, der ligger inden for den skønnede nøjagtighed (jf. tabel 1).

De målte kogetemperaturer og gennemsnittet heraf skal anføres, og det tryk, hvorved målingerne er foretaget, opgives i kPa. Trykket skal helst ligge nær standardatmosfæretryk.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand skal anføres.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, volume II.

(3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

▼B

*Tillæg*

*Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder*

1. **Ebulliometer**

1.1. Smeltepunktsapparater med væskebad

| | |
|---|---|
| ASTM D 1120-72 | Standard test method for boiling point of engine anti-freezes |

2. **Destillationsforløb (kogepunktsinterval)**

| | |
|---|---|
| ISO/R 918 | Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range) |
| BS 4349/68 | Method for determination of distillation of petroleum products |
| BS 4591/71 | Method for the determination of distillation characteristics |
| DIN 53171 | Losungsmittel fur Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes |
| NF T 20-608 | Distillation:determination du rendement et de l'intervalle de distillation |

3. **Differential termoanalyse og differential scanning kalorimetri**

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

▼B

## A.3. RELATIV MASSEFYLDE

### 1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2).

### 1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder til bestemmelse af relativ massefylde kan anvendes for faste stoffer og væsker uanset renheden. De forskellige metoder, som kan anvendes, er anført i tabel 1.

### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den relative massefylde, $D_4^{20}$, af faste stoffer og væsker er forholdet mellem massen af et rumfang af det undersøgte stof bestemt ved 20 °C og massen af det samme rumfang vand bestemt ved 4 °C. Den relative massefylde er dimensionsløs.

Massefylden, P, af et stof er dets masse m divideret med dets rumfang v.

Massefylden, P, opgives i $kg/m^3$ (SI-enheder).

### 1.3. REFERENCESTOFFER (1) (3)

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

### 1.4. METODERNES PRINCIP

Der benyttes fire typer metoder.

#### 1.4.1. **Opdriftsmetoder**

##### 1.4.1.1. *Aræometer* (for væsker)

Der kan opnås tilstrækkelig nøjagtige og hurtige massefyldebestemmelser med aræometre, hvor massefylden af en væske udledes af flydehøjden ved aflæsning på en skala.

##### 1.4.1.2. *Hydrostatisk vægt* (for væsker og faste stoffer)

Forskellen mellem massen af en prøve i henholdsvis atmosfærisk luft og en passende væske (f.eks. vand) kan anvendes til at bestemme dens massefylde.

For faste stoffer er den fundne massefylde kun repræsentativ for den bestemte prøve, som er anvendt til bestemmelsen. Til bestemmelse af væskers massefylde vejes et legeme med kendt rumfang v først i atmosfærisk luft og dernæst i væsken.

##### 1.4.1.3. *Metode med nedsænket legeme* (for væsker) (4)

Ved denne metode bestemmes en væskes massefylde ud fra forskellen mellem resultaterne af vejning af væsken før og efter nedsænkning af et legeme med kendt rumfang her.

▼B

1.4.2. **Pyknometermetoder**

Pyknometre af forskellig udformning og med kendt rumfang kan anvendes for faste stoffer og væsker. Massefylden beregnes ud fra masseforskellen mellem det fulde og det tomme pyknometer og dets kendte rumfang.

1.4.3. **Luftsammenligningspyknometer** (for faste stoffer)

Massefylden af et fast stof i enhver form kan bestemmes ved stuetemperatur med et gassammenligningspyknometer. Rumfanget af en prøve af stoffet måles i atmosfærisk luft eller i en inaktiv luftart i en beholder med korrigeret rumfangsinddeling. Til beregning af massefylden foretages efter rumfangsbestemmelsen en bestemmelse af prøvens masse.

1.4.4. **Oscillerende densitometer** (5) (6) (7)

Massefylden af en væske kan bestemmes med et oscillerende densitometer. En mekanisk oscillator i form af et U-rør sættes i svingning ved sin resonansfrekvens, der afhænger af dens masse. Når der indføres en prøve heri, ændres oscillatorens resonansfrekvens. Apparatet kalibreres med to væsker med kendt massefylde. Disse stoffer vælges fortrinsvis således, at deres massefylde ligger i hver sin ende af det pågældende måleområde.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Anvendeligheden af de forskellige metoder, der anvendes til bestemmelse af den relative massefylde, er opstillet i tabellen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Tillægget indeholder en liste over nogle standarder, hvorfra yderligere tekniske detaljer kan hentes.

Målingerne skal udføres ved 20 °C, og der foretages mindst to bestemmelser.

2. **DATA**

Se standarderne.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (art og urenheder) og eventuel indledende rensning.

Den under 1.2 definerede relative massefylde $D_4^{20}$ rapporteres tillige med det undersøgte stofs fysiske tilstand.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand, skal anføres.

▼B

*Tabel*

**Metodernes anvendelighed**

| Målemetode | Massefylde | | Maksimal dynamisk viskositet | Foreliggende standarder |
|---|---|---|---|---|
| | fast stof | væske | | |
| 1.4.1.1. Aræometer | | ja | 5 Pa s | ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050 |
| 1.4.1.2. Hydrostatik vægt | | | | |
| a) faste stoffer | ja | | | ISO 1183 (A) |
| b) væsker | | ja | 5 Pa S | ISO 901 og 758 |
| 1.4.1.3. Metode med nedsænket legeme | | ja | 20 Pa s | DIN 53217 |
| 1.4.2. Pyknometer | | | | ISO 3507 |
| a) faste stoffer | ja | | | ISO 1183 (B), NF T 20-053 |
| b) væsker | | ja | 500 Pa s | ISO 758 |
| 1.4.3. Luftssammenligningspyknometer | ja | | | DIN 55990 Teil 3, DIN 53243 |
| 1.4.4. Oscillerende densitometer | | ja | 5 Pa s | |

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.II, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717 - 726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digital en Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

▼B

*Tillæg*

*Der findes supplerende tekniske oplysninger i nedenstående standarder:*

1. **Opdriftsmetoder**

1.1. Aræometer

| | |
|---|---|
| DIN 12790, ISO 387 | Hydrometer; general instructions |
| DIN 12791 | Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use<br>Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation<br>Part III: Use and test |
| ISO 649-2 | Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose |
| NF T 20-050 | Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method |
| DIN 12793 | Laboratory glassware: range find hydrometers |

1.2. Hydrostatisk vægt

*For faste stoffer*

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics |
| NF T 20-049 | Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method |
| ASTM-D-792 | Specific gravity and density of plastics by displacement |
| DIN 53479 | Testing of plastics and elastomers; determination of density |

*For væsker*

| | |
|---|---|
| ISO 901 | ISO 758 |

▼B

| | |
|---|---|
| DIN 51757 | Testing of mineral oils and related materials; determination of density |

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 og ASTM D 1481-62

| | |
|---|---|
| ASTM D 1298 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |
| BS 4714 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |

1.3. Metode med nedsænket legeme

| | |
|---|---|
| DIN 53217 | Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method |

2. **Pyknometermetoder**

2.1. For væsker

| | |
|---|---|
| ISO 3507 | Pycnometers |
| ISO 758 | Liquid chemical products; determination of density at 20 °C |
| DIN 12797 | Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous) |
| DIN 12798 | Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100{,}10^{-6}$ $m^2$ $s^{-1}$ at 15 °C) |
| DIN 12800 | Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798) |
| DIN 12801 | Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100{,}10^{-6}$ $m^2$ $s^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C) |

▼B

| | |
|---|---|
| DIN 12806 | Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen) |
| DIN 12807 | Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801) |
| DIN 12808 | Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol — water mixture) |
| DIN 12809 | Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous) |
| DIN 53217 | Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer |
| DIN 51757 | Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density |
| ASTM D 297 | Section 15: Rubber products — chemical analysis |
| ASTM D 2111 | Method C: Halogenated organic compounds |
| BS 4699 | Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method) |
| BS 5903 | Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary — stoppered pycnometer method |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method |

▼B

2.2. For faste stoffer

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method |
| DIN 19683 | Determination of the density of soils |

3. **Luftsammenligningspyknometer**

| | |
|---|---|
| DIN 55990 | Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichrungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte |
| DIN 53243 | Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung |

▼M1

## A.4. DAMPTRYK

### 1. METODE

Metoden er ækvivalent med OECD TG 104 (2004).

### 1.1. INDLEDNING

Denne reviderede version af metode A.4 (1) omfatter én supplerende metode, effusionsmetoden: isoterm termogravimetri, som er udviklet til stoffer med meget lavt tryk (ned til $10^{-10}$ Pa). Da der er et særligt behov for metoder til måling af damptrykket af stoffer med lavt damptryk, er de øvrige procedurer i denne metode revurderet med hensyn til andre anvendelsesområder.

Ved termodynamisk ligevægt er damptrykket af et rent stof alene en funktion af temperaturen. Grundprincipperne findes beskrevet andetsteds (2)(3).

Ingen enkelt måleteknik kan anvendes på hele trykområdet fra mindre end $10^{-10}$ til $10^5$ Pa. I denne metode til damptrykmåling indgår otte metoder, som kan anvendes i forskellige damptrykintervaller. I tabel 1 sammenlignes de forskellige metoders anvendelighed og måleområde. Metoderne kan kun bruges på forbindelser, der ikke dekomponeres under de pågældende testbetingelser. I tilfælde, hvor de eksperimentelle metoder af tekniske grunde ikke kan anvendes, kan et tilnærmet damptryk beregnes, og i tillægget beskrives en anbefalet beregningsmetode.

### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Ved damptrykket af et stof forstås mætningstrykket over stoffet i fast eller flydende tilstand.

Som trykenhed bør anvendes SI-enheden, der er pascal (Pa). Nedenfor er angivet andre, tidligere anvendte enheder og de tilhørende omregningsfaktorer:

| | | |
|---|---|---|
| 1 Torr | = 1 mm Hg | = $1{,}333 \times 10^2$ Pa |
| 1 atmosfære | = $1{,}013 \times 10^5$ Pa | |
| 1 bar | = $10^5$ Pa | |

SI-enheden for temperatur er kelvin (K). Omregning af grader celsius til kelvin sker med formlen:

$$T = t + 273{,}15$$

hvor T er kelvin-temperaturen eller den termodynamiske temperatur, og t er temperaturen i grader celsius.

▼**M1**

*Tabel 1*

| Målemetode | Stof | | Anslået repeterbarhed | Anslået Reproducerbarhed | Anbefalet område |
|---|---|---|---|---|---|
| | Faststof | Væske | | | |
| Den dynamiske metode | Letsmelteligt | Ja | indtil 25 %<br>1 til 5 % | indtil 25 %<br>1 til 5 % | $10^3$ Pa til $2 \times 10^3$ Pa<br>$2 \times 10^3$ Pa til $10^5$ Pa |
| Den statiske metode | Ja | Ja | 5 til 10 % | 5 til 10 % | 10 Pa til $10^5$ Pa<br>$10^{-2}$ Pa til $10^5$ Pa (1) |
| Isoteniskop-metoden | Ja | Ja | 5 til 10 % | 5 til 10 % | $10^2$ Pa til $10^5$ Pa |
| Effusionsmetoden: damptrykbalance | Ja | Ja | 5 til 20 % | indtil 50 % | $10^{-3}$ til 1 Pa |
| Effusionsmetoden: Knudsen-celle | Ja | Ja | 10 til 30 % | — | $10^{-10}$ til 1 P |
| Effusionsmetoden: isotermisk termogravimetri | Ja | Ja | 5 til 30 % | indtil 50 % | $10^{-10}$ til 1 Pa |
| Gasmætnings-metoden | Ja | Ja | 10 til 30 % | indtil 50 % | $10^{-10}$ til $10^3$ Pa |
| Metoden med roterende kugle | Ja | Ja | 10 til 20 % | — | $10^{-4}$ til 0,5 Pa |

(1) Ved brug af kapacitansmanometer.

1.3. TESTENS PRINCIP

Sædvanligvis bestemmes damptrykket ved forskellige temperaturer. Inden for et begrænset temperaturområde er logaritmen til damptrykket af et rent stof en lineær funktion af den reciprokke termodynamiske temperatur ifølge den forenklede Clausius-Clapeyron-ligning:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2,3RT} + konstant$$

hvor:

p = damptrykket i pascal

ΔHv = fordampningsvarmen i J $mol^{-1}$

R = den universelle gaskonstant, 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

T = temperaturen i K

▼M1

1.4. REFERENCESTOFFER

Referencestoffer behøver ikke anvendes. De bruges hovedsagelig til lejlighedsvis kontrol af en metodes præstationer og til at sammenligne resultaterne fra forskellige metoder.

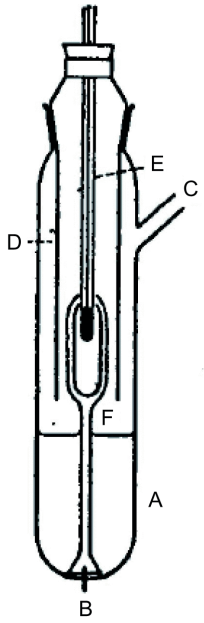
1.5. BESKRIVELSE AF METODEN

1.5.1. **Den dynamiske metode (Cottrells metode)**

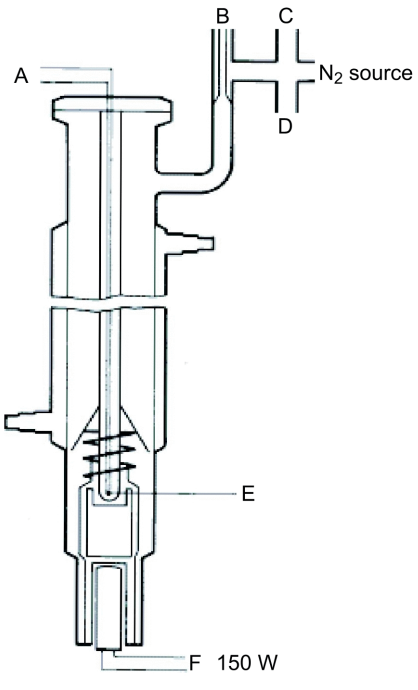
1.5.1.1. *Princip*

Damptrykket bestemmes ved måling af stoffets kogepunktstemperatur ved forskellige givne tryk mellem ca. $10^3$ og $10^5$ Pa. Metoden anbefales også til kogepunktsbestemmelse. Til det formål er metoden brugbar op til 600 K. Væskers kogepunktstemperatur er ca. 0,1 °C højere i en dybde af 3-4 cm end ved overfladen på grund af det hydrostatiske tryk fra væskesøjlen. I Cottrells metode (4) er termometeret placeret i dampen over væskeoverfladen, og den kogende væske bringes til konstant at pumpe sig selv ud over termometerets kugle. Kuglen er dækket af et tyndt lag væske, der er i ligevægt med dampen ved atmosfæretryk. Termometeret viser derfor det sande kogepunkt uden fejl pga. overhedning eller hydrostatisk tryk. Den oprindelige pumpe, som Cottrell anvendte, ses i figur 1. Rør A indeholder den kogende væske. En indlejret platintråd B i bunden gør kogningen mere ensartet. Siderøret C fører til en kondensator, og kappen D forhindrer det kolde kondensat i at nå termometeret E. Når væsken i A koger, bliver bobler og væske opfanget af tragten og via de to arme af pumpen F ledt ud over termometerets kugle.

*Figur 1*




*Figur 2*



▼**M1**

Cottrell-pumpe (4)

A: Termoelement

B: Vakuum-stødpudevolumen

C: Trykmåler

D: Vakuum

E: Målepunkt

F: Varmeelement, ca. 150 W

1.5.1.2. *Apparatur*

I figur 2 er vist et meget nøjagtigt apparat, der arbejder efter Cottrells princip. Det består af et rør med en kogesektion i underdelen, en svaler i midten og en afgang med flange i overdelen. Cottrell-pumpen er anbragt i kogesektionen, der opvarmes af en elektrisk varmepatron. Temperaturen måles af et termoelement med kappe eller af et modstandstermometer, der er ført gennem flangen foroven. Afgangen er tilsluttet trykreguleringssystemet. Dette består af en vakuumpumpe, et stødpudevolumen, en trykregulator for tilførsel af nitrogen til trykregulering og et manometer.

1.5.1.3. *Fremgangsmåde*

Stoffet anbringes i kogesektionen. Faste stoffer, der ikke er pulverformige, kan volde problemer, som dog undertiden kan løses ved opvarmning af kølekappen. Apparatet forsegles ved flangen, og stoffet afgasses. Skumdannende stoffer kan ikke måles med denne metode.

Derefter sættes det laveste ønskede tryk, og der tændes for opvarmningen. Samtidig tilsluttes temperaturføleren til en skriver.

Ligevægt er nået, når der registreres konstant kogetemperatur ved konstant tryk. Særlig omhu må udvises for at undgå stødkogning. Desuden skal kondensationen i svaleren være fuldstændig. Ved damptryksbestemmelse for letsmeltelige faste stoffer skal man passe på, at svaleren ikke bliver tilstoppet.

Efter at dette ligevægtspunkt er nået, sættes et højere tryk. Processen fortsættes på denne måde, indtil $10^5$ Pa er nået (i alt 5 til 10 målepunkter). Som kontrol gentages ligevægtspunkterne ved faldende værdier af trykket.

1.5.2. **Den statiske metode**

1.5.2.1. *Princip*

Ved den statiske metode (5) bestemmes damptrykket i termodynamisk ligevægt ved en fastlagt temperatur. Metoden er velegnet til enkeltstoffer samt væsker og faste stoffer bestående af flere komponenter i området fra $10^{-1}$ til $10^5$ Pa samt, med tilstrækkelig omhu, i området 1 til 10 Pa.

▼**M1**

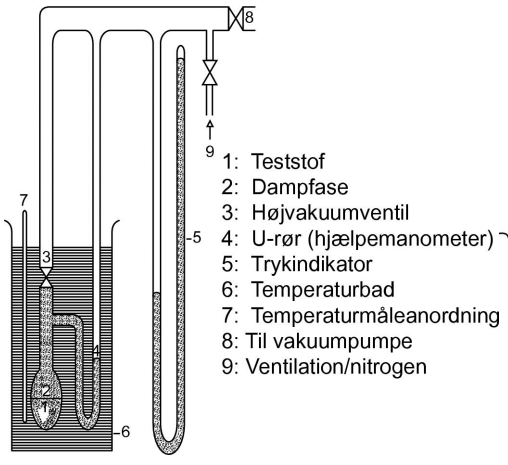
1.5.2.2. *Apparatur*

Apparatet består af et termostatbad (præcision ± 0,2 K), en prøvebeholder tilsluttet en vakuumledning, et manometer og et system til trykregulering. Prøvekammeret (figur 3a) er tilsluttet vakuumledningen gennem en ventil og et differensmanometer (et U-rør indeholdende en egnet manometervæske), der fungerer som nulindikator. I differensmanometeret kan anvendes kviksølv, siliconeolie og phthalater, afhængigt af trykområdet og teststoffets kemiske egenskaber. Kviksølv bør dog om muligt undgås af hensyn til miljøet. Teststoffet må ikke være nævneværdigt opløseligt i væsken i U-røret eller kunne reagere med denne. I stedet for U-røret kan anvendes en trykmåler (figur 3b). I manometeret kan kviksølv anvendes i området fra normalt tryk ned til $10^2$ Pa, mens siliconeolier og phthalater er egnede ved tryk under $10^2$ Pa ned til 10 Pa. Der findes andre trykmålere, som kan anvendes ved tryk under $10^2$ Pa, og opvarmede membrankapacitetsmanometre kan endda bruges ved tryk under $10^{-1}$ Pa. Temperaturen måles enten på ydervæggen af den beholder, som indeholder prøven, eller i selve beholderen.

1.5.2.3. *Fremgangsmåde*

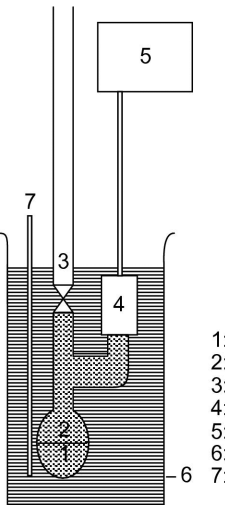
I det i figur 3a beskrevne apparatur fyldes U-røret med den valgte væske, som skal afgasses ved forhøjet temperatur, før der aflæses. Teststoffet anbringes i apparatet og afgasses ved reduceret temperatur. For prøver med flere komponenter skal temperaturen være tilstrækkelig lav til at sikre, at materialets sammensætning ikke ændres. Ligevægt kan nås hurtigere ved omrøring. Prøven kan køles med flydende nitrogen eller tøris, men der må udvises forsigtighed, så kondensation af luft eller pumpevæske undgås. Mens ventilen over prøvebeholderen er åben, tilsluttes sugningen i nogle minutter for at fjerne luften. Om nødvendigt gentages afgasningen nogle gange.

*Figur 3a*




1: Teststof
2: Dampfase
3: Højvakuumventil
4: U-rør (hjælpemanometer)
5: Trykindikator
6: Temperaturbad
7: Temperaturmåleanordning
8: Til vakuumpumpe
9: Ventilation/nitrogen

*Figur 3b*




1: Teststof
2: Dampfase
3: Højvakuumventil
4: Trykmåler
5: Trykindikator
6: Temperaturbad
7: Temperaturmåleanordning

▼**M1**

Når prøven opvarmes med lukket ventil, stiger damptrykket. Derved ændres væskeligevægten i U-røret. For at kompensere herfor lukkes der nitrogen eller luft ind i apparatet, indtil differenstrykindikatoren igen viser nul. Det nødvendige tryk hertil kan aflæses på manometeret eller på et instrument med større præcision. Dette tryk svarer til stoffets damptryk ved måletemperaturen. På det i figur 3b viste apparatet aflæses damptrykket direkte.

Damptrykket bestemmes med passende små temperaturintervaller (ca. 5 til 10 målepunkter i alt) op til den ønskede maksimumtemperatur.

Lavtemperaturaflæsningerne skal gentages som kontrol. Hvis værdierne fra gentagelserne ikke falder sammen med den kurve, der er opnået ved stigende temperatur, kan dette have følgende årsager:

i) prøven indeholder stadig luft (f.eks. ved højviskøse materialer) eller flygtige stoffer, der frigives ved opvarmning

ii) stoffet undergår en kemisk reaktion i det undersøgte temperaturområde (f.eks. dekomposition eller polymerisering).

1.5.3. **Isoteniskop-metoden**

1.5.3.1. *Princip*

Isoteniskopet (6) bygger på den statiske metodes princip. I metoden anbringes en prøve i en kugle, der holdes ved konstant temperatur og er tilsluttet til et manometer og en vakuumpumpe. Urenheder, der er flygtigere end stoffet, fjernes ved afgasning ved reduceret tryk. Prøvens damptryk ved de valgte temperaturer afbalanceres ved et kendt tryk af inert gas. Isoteniskopet er oprindeligt udviklet til måling af damptrykket af visse flydende kulbrinter, men egner sig også til undersøgelse af faste stoffer. Metoden egner sig normalt ikke til systemer med flere komponenter. Resultaterne er kun behæftet med små fejl for prøver indeholdende ikke-flygtige urenheder. Det anbefalede område er $10^2$ til $10^5$ Pa.

1.5.3.2. *Apparatur*

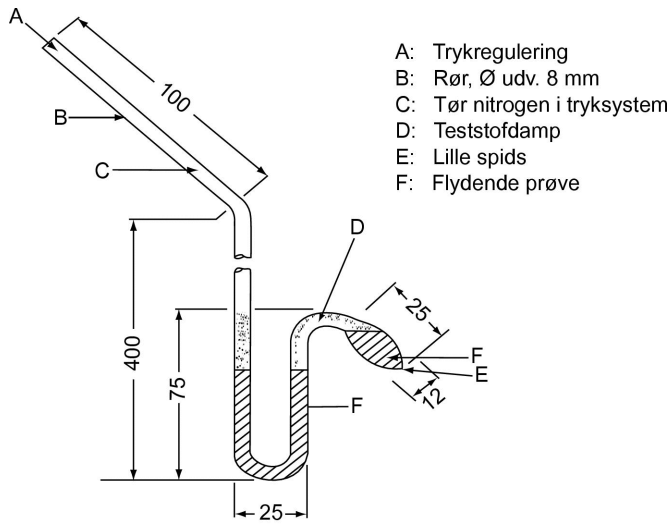
Et eksempel på en måleanordning er vist i figur 4. En komplet beskrivelse kan findes i ASTM D 2879-86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Fremgangsmåde*

Når teststoffet er en væske, fungerer den selv som manometervæske i differensmanometeret. Isoteniskopet påfyldes så meget af væsken, at manometerets kugle og korte gren er fyldt. Isoteniskopet tilslutte et vakuumsystem og udpumpes, hvorefter det fyldes med nitrogen. Udpumpningen og gennemskylningen af systemet gentages to gange for at fjerne tilbageværende oxygen. Det påfyldte isoteniskop anbringes vandret, så prøven fordeler sig i et tyndt lag i prøvekuglen og manometeret. Trykket i systemet nedsættes til 133 Pa, og prøven opvarmes forsigtigt, til den netop koger (fjernelse af opløste gasser). Isoteniskopet anbringes derefter, så prøven løber tilbage i kuglen og fylder manometerets korte gren. Trykket holdes på 133 Pa. Prøvekuglens udtrukne spids opvarmes med en svag flamme, indtil den afgivne damp fra teststoffet har udvidet sig så meget, at en del af prøven fra den øverste del af kuglen og manometergrenen fortrænges ind i manometeret og derved danner et dampfyldt, nitrogenfrit rum. Isoteniskopet anbringes derefter i et termostatbad, og nitrogentrykket indstilles, til det er lig prøvens. I ligevægt er nitrogentrykket lig med teststoffets damptryk.

*Figur 4*




(alle mål i mm)

Til faste stoffer anvendes som manometervæske siliconeolie eller phthalater, afhængigt af tryk- og temperaturområdet. Den afgassede manometervæske fyldes i en udposning på isoteniskopets lange gren. Det faste stof, der skal undersøges, anbringes i prøvekuglen og afgasses ved en forhøjet temperatur. Derefter holdes isoteniskopet skråt, så manometervæsken kan løbe ind i U-røret.

▼M1

1.5.4. **Effusionsmetoden: damptrykvægt** (7)

1.5.4.1. *Princip*

Teststoffet opvarmes i en lille ovn og anbringes i en udpumpet glasklokke. Ovnen er dækket af et låg med små huller med kendt diameter. Den damp, som fra stoffet afgives gennem et af hullerne, ledes op mod vægtskålen på en meget fintmærkende vægt, der ligeledes er placeret i den udpumpede glasklokke. I nogle udformninger er vægtskålen omgivet af en køleboks, der leder varmen bort til omgivelserne ved varmeledning, og den køles ved stråling, så den udslippende damp kondenserer på den. Dampstrålens impuls påfører en kraft på vægten. Damptrykket kan beregnes på to måder: direkte af kraften på vægtskålen og af fordampningshastigheden ved hjælp af Hertz-Knudsen-ligningen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

hvor:

G = fordampningshastighed (kg $s^{-1}$ $m^{-2}$)

M = molær masse (g $mol^{-1}$)

T = temperatur (K)

R = den universelle gaskonstant (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

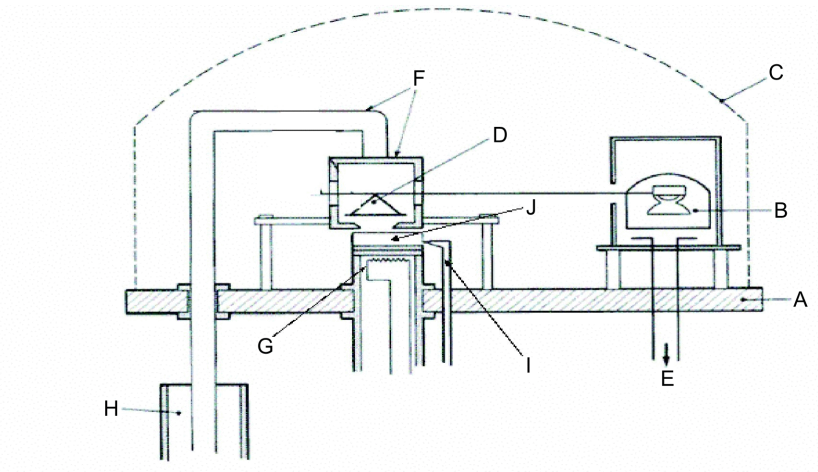
P = damptryk (Pa)

Det anbefalede område er $10^{-3}$ til 1 Pa.

1.5.4.2. *Apparatur*

Det generelle princip i apparatet er vist i figur 5.

*Figur 5*




A: Bundplade

B: Drejespoleinstrument

C: Glasklokke

D: Vægt med vægtskål

E: Anordning til måling af vakuum

F: Køleboks og kølestang

G: Muffelovn

H: Dewarkar med flydende nitrogen

I: Måling af prøvens temperatur

J: Teststof

▼M1

1.5.5. **Effusionsmetoden: Knudsen-celle**

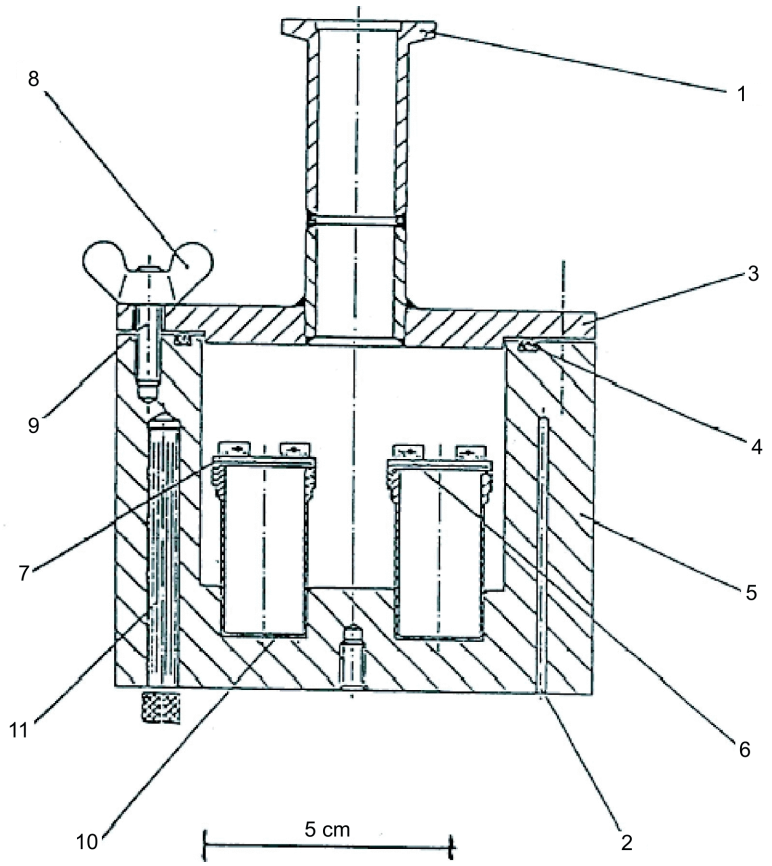
1.5.5.1. *Princip*

Metoden bygger på bestemmelse af den masse af dampformigt teststof, der pr. tidsenhed strømmer ud af en Knudsen-celle (8) gennem en mikroskopisk åbning under ekstremt vakuum. Massen af udstrømmede damp kan enten bestemmes af cellens massetab eller ved at lade dampen kondensere ved lav temperatur og bestemme den fordampede stofmængde ved kromatografi. Damptrykket beregnes ved at anvende Hertz-Knudsen-relationen (se punkt 1.5.4.1) med korrektionsfaktorer, der afhænger af apparaturets parametre (9). Det anbefalede område er $10^{-10}$ til 1 Pa (10)-(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Apparatur*

Apparatets generelle princip er illustreret i figur 6.

*Figur 6*




1: Vakuumtilslutning

2: Huller fra platinmodstandstermometer eller temperaturmåling og -kontrol

3: Låg til vakuumbeholder

4: O-ring

5: Vakuumbeholder af aluminium

6: Anordning til isætning og udtagning af effusionsceller

7: Skruelåg

8: Vingemøtrikker

9: Bolte

10: Effusionsceller af rustfrit stål

11: Varmepatron

▼M1

1.5.6. **Effusionsmetoden: isotermisk termogravimetri**

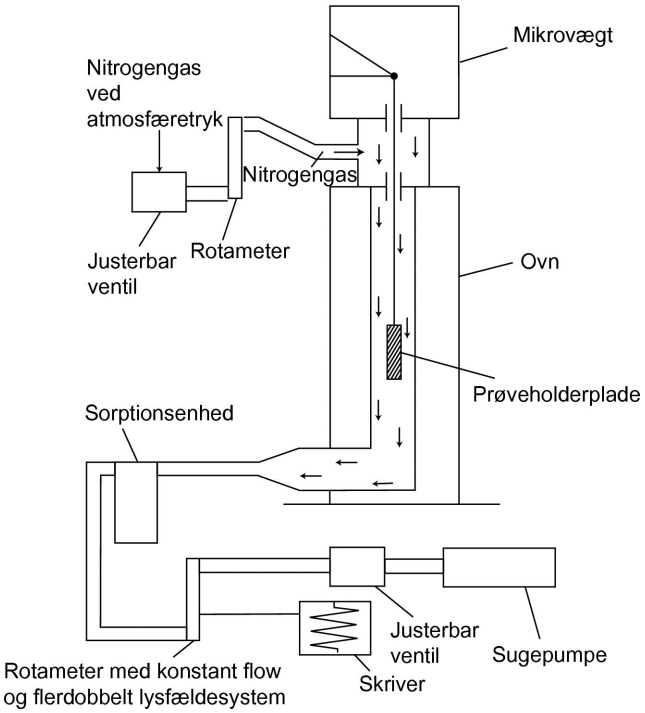
1.5.6.1. *Princip*

Metoden bygger på bestemmelse af stigningen i teststoffets fordampningshastighed ved forhøjet temperatur og atmosfæretryk ved hjælp af termogravimetri (10)(15)(16)(17)(18)(19)(20). Fordampningshastighederne $v_T$ bestemmes ved, at den valgte forbindelse eksponeres for en atmosfære af langsomt strømmende inert gas, mens vægttabet overvåges ved fastlagte isotermiske temperaturer T i kelvin i passende tidsrum. Damptrykkene $p_T$ beregnes af $v_T$-værdierne ved udnyttelse af den lineære sammenhæng mellem logaritmen til damptrykket og logaritmen til fordampningshastigheden. Om nødvendigt kan der ekstrapoleres til temperaturerne 20 og 25 °C ved regressionsanalyse af log $p_T$ som funktion af 1/T. Metoden er egnet til stoffer med damptryk helt ned til $10^{-10}$ Pa ($10^{-12}$ mbar) og med en renhed så tæt som muligt på to 100 % for at undgå fejlfortolkning af målte vægttab.

1.5.6.2. *Apparatur*

Det generelle princip i testopstillingen er vist i figur 7.

*Figur 7*




Prøveholderpladen er ophængt i en mikrovægt i et kammer med kontrolleret temperatur, hvor der strømmer tør nitrogengas forbi den, som fjerner de fordampede molekyler af teststof. Efter at have forladt kammeret bliver gasstrømmen renset i en sorptionsenhed.

1.5.6.3. *Fremgangsmåde*

Teststoffet påføres som et homogent lag på en matteret glasplade. For faste stoffer vædes pladen ensartet med en opløsning af stoffet i et egnet opløsningsmiddel og tørres i inert atmosfære. Målingen sker ved, at den overtrukne plade hænges op i den termogravimetriske analysator, hvorefter dens vægttab registreres kontinuerligt som funktion af tiden.

▼M1

Fordampningshastigheden $v_T$ ved en nærmere angivet temperatur beregnes af prøvepladens vægttab Dm ved hjælp af udtrykket

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \ (\text{g cm}^{-2}\text{h}^{-1})$$

hvor F er teststoflagets overfladeareal, sædvanligvis prøvepladens overfladeareal, og t er tiden svarende til vægttabet Δm.

Damptrykket $p_T$ beregnes af funktionen for fordampningshastigheden $v_T$:

$$\log p_T = C + D \log v_T$$

hvor C og D er konstanter, der er specifikke for den anvendte testopstilling og afhænger af målekammerets diameter og af gassens strømningshastighed. Disse konstanter bestemmes én gang for alle ved måling på et sæt forbindelser med kendt damptryk og regression af log $p_T$ mod log $v_T$ (11)(21)(22).

Sammenhængen mellem damptrykket $p_T$ og temperaturen T i kelvin er givet ved

$$\log p_T = A + B \ 1/T$$

hvor A og B er konstanter, der fås ved regression af log $p_T$ mod 1/T. Heraf kan damptrykket ved en vilkårlig temperatur beregnes ved ekstrapolation.

1.5.7. **Gasmætningsmetoden** (23)

1.5.7.1. *Princip*

En inert gas ledes ved rumtemperatur og med kendt flowhastighed gennem eller hen over en prøve af teststoffet, tilstrækkelig langsomt til at sikre mætning. Det er afgørende, at gassen når til mætning. Det transporterede stof opfanges, sædvanligvis med hjælp af et sorptionsmiddel, og dets mængde bestemmes. I stedet for opsamling af dampen og efterfølgende analyse kan man benytte in-line analyse, f.eks. ved gaskromatografi, til kvantitativ bestemmelse af den transporterede mængde materiale. Damptrykket beregnes, idet det forudsættes, at idealgasloven gælder, og at det totale tryk af en gasblanding er lig summen af gassernes partialtryk. Teststoffets partialtryk, dvs. damptrykket, beregnes af det kendte totale gasvolumen og vægten af det transporterede materiale.

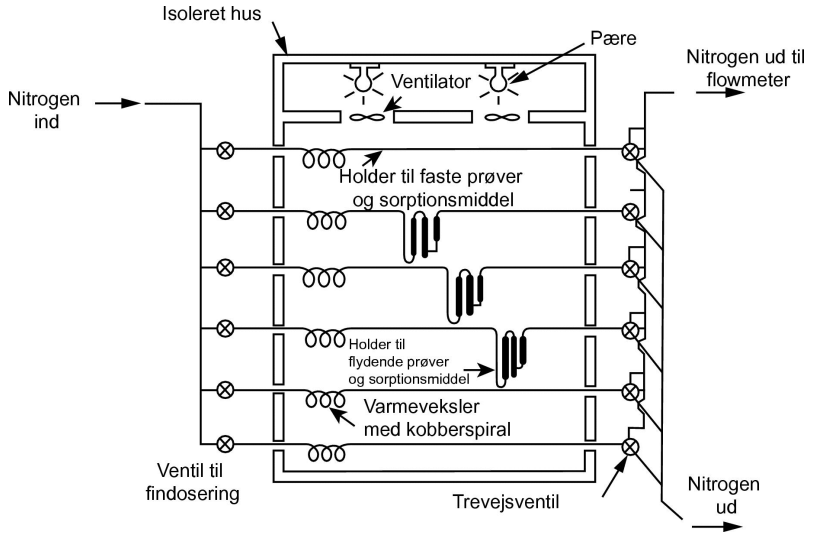
Gasmætningsmetoden er anvendelig på faste og flydende stoffer. Den kan anvendes på damptryk ned til $10^{-10}$ Pa (10)(11)(12)(13)-(14). Metoden er mest pålidelig ved damptryk under $10^3$ Pa. Over $10^3$ Pa bliver damptrykket sædvanligvis overvurderet, antagelig som følge af aerosoldannelse. Da damptrykket måles ved stuetemperatur, undgår man at skulle ekstrapolere fra høje temperaturer, hvilket ofte kan medføre alvorlige fejl.

1.5.7.2. *Apparatur*

Metoden kræver brug af et termostateret hus. Skitsen i figur 8 viser et hus, der med tre holdere til faste og tre til flydende prøver giver mulighed for tredobbelte analyser af enten et fast eller et flydende teststof. Temperaturen styres med en nøjagtighed på ± 0,5 °C eller bedre.

▼**M1**

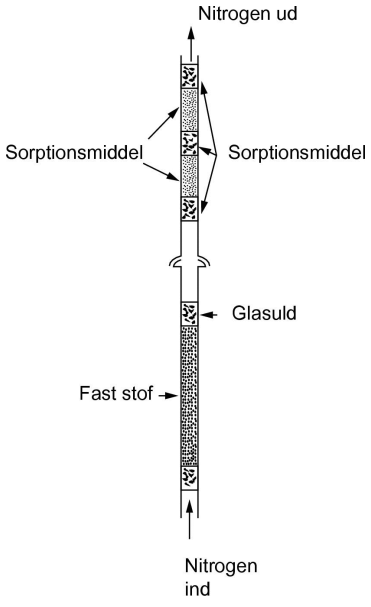
*Figur 8*



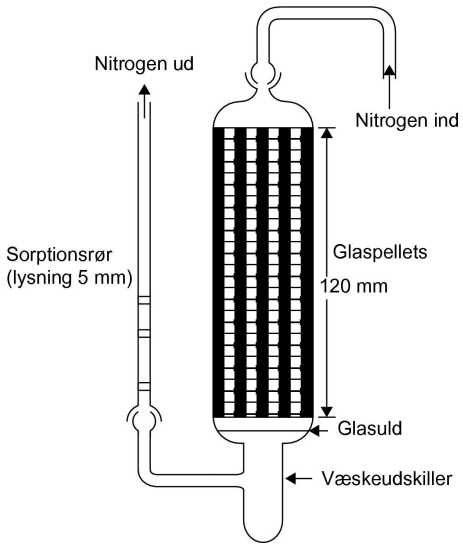

Som bæregas anvendes sædvanligvis nitrogen, men brug af en anden gas kan undertiden være nødvendig (24). Bæregassen skal være tør. Gasstrømmen opdeles i 6 strømme, der styres ved hjælp af nåleventiler (med en åbning på ca. 0,79 mm) og ledes ind i huset gennem et kobberrør med en lysning på 3,8 mm. Efter temperaturudligning ledes gassen gennem prøven og sorptionsfælden og forlader huset.

Faste prøver anbringes med glasuldspropper på hver side i et glasrør med 5 mm lysning (se figur 9). Figur 10 viser en prøveholder til væskeformige prøver og sorptionssystemet. Den mest reproducerbare metode til måling af væskers damptryk er at påføre væsken på glaspellets eller på et inert sorptionsmiddel såsom silica og pakke holderen med disse pellets. Bæregassen kan i stedet ledes gennem en grov glasfritte og gennemboble en kolonne med flydende teststof.

*Figur 9*




*Figur 10*



▼**M1**

Sorptionssystemet indeholder en forreste sorptionssektion og en backup-sorptionssektion. Ved meget lave damptryk et det kun små mængder, der indfanges af sorptionsmidlet, og adsorption til glasulden og glasrøret mellem prøven og sorptionsmidlet kan være et alvorligt problem.

En anden effektiv metode til opsamling af det fordampede materiale er dampfælder kølet med tøris. De giver ikke modtryk i mætningskolonnen, og det opfangede materiale kan let fjernes fuldstændigt.

1.5.7.3. *Fremgangsmåde*

Flowhastigheden af den udstrømmende bæregas måles ved rumtemperatur. Flowhastigheden kontrolleres ofte under testen for at sikre nøjagtig bestemmelse af det totale volumen bæregas. Hertil bør fortrinsvis anvendes kontinuerlig overvågning med et masseflowmeter. For at gasfasen skal blive mættet, kan det være nødvendigt med en ret lang kontakttid og dermed en lav flowhastighed af gassen (25).

Ved testens slutning skal den forreste sorptionssektion og backup-sorptionssektionen analyseres hver for sig. Stoffet på hver sektion desorberes ved tilsætning af et opløsningsmiddel. De resulterende opløsninger analyseres kvantitativt til bestemmelse af den desorberede vægt fra hver sektion. Valg af analysemetode (herunder valg af sorptionsmiddel og opløsningsmiddel til desorption) træffes ud fra teststoffets beskaffenhed. Effektiviteten af desorptionen bestemmes ved, at en kendt mængde teststof injiceres på sorptionsmidlet, hvorefter det desorberes, og den genfundne mængde bestemmes. Det er vigtigt at bestemme effektiviteten af desorptionen ved en koncentration svarende til prøvens og under samme betingelser som i testen.

For at sikre, at bæregassen er mættet med teststof, anvendes tre forskellige flowhastigheder af gassen. Hvis det beregnede damptryk viser sig at være uafhængigt af flowhastigheden, kan gassen antages at være mættet.

Damptrykket beregnes af udtrykket:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

hvor:

P = damptryk (Pa)

W = masse af det fordampede teststof (g)

V = volumen af den mættede gas ($m^3$)

R = den universelle gaskonstant 8,314 (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

T = temperatur (K)

M = teststoffets molmasse (g $mol^{-1}$)

De målte volumener skal korrigeres for tryk- og temperaturforskelle mellem flowmeteret og mætningskolonnen.

▼M1

1.5.8. **Roterende kugle**

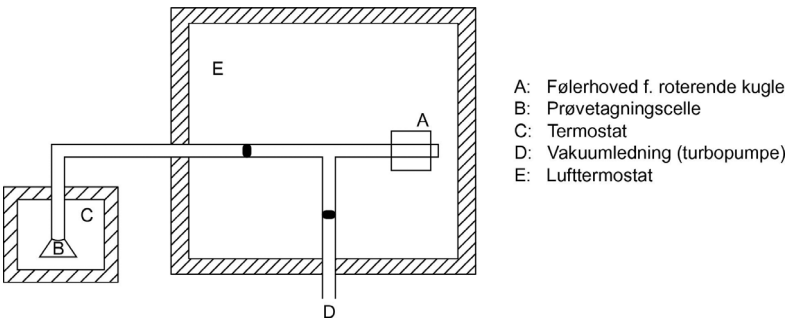
1.5.8.1. *Princip*

I metoden anvendes et viskosimeter, hvis måleelement er en lille stålkugle, som holdes svævende i et magnetisk felt og sættes i rotation af roterende felter (26)(27)(28). Kuglens rotationshastighed måles med detektorspoler. Når kuglen har nået en given rotationshastighed, sædvanligvis ca. 400 o./min., standses energitilførslen til kuglen, som derefter bremses af gasfriktionen. Faldet i rotationshastigheden registreres som funktion af tiden. Damptrykket afledes af den trykafhængige nedbremsning af stålkuglen. Det anbefalede område er $10^{-4}$ til 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Apparatur*

Testopstillingen er vist skematisk i figur 11. Målehovedet er placeret i et termostateret hus, der er reguleret inden for 0,1 °C. Prøveholderen er placeret i et separat hus, der ligeledes er reguleret inden for 0,1 °C. Alle de øvrige dele af testopstillingen holdes ved højere temperatur for at undgå kondensation. Hele apparatet er tilsluttet et højvakuum-system.

*Figur 11*




2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Damptrykket skal bestemmes ved mindst to temperaturer med en af ovenstående metoder. I området 0 til 50 °C bør fortrinsvis anvendes tre eller flere temperaturer for at eftervise damptrykkurvens linearitet. Ved effusionsmetoden (Knudsen-celle og isotermisk termogravimetri) og ved gasmætningsmetoden anbefales 120 til 150 °C som temperaturområde for målingen i stedet for 0 til 50 °C.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— den anvendte metode

▼**M1**

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder) og eventuelle indledende rensningstrin

— mindst to værdier af damptryk og temperatur (helst tre eller flere) — i området fra 0 til 50 °C (eller 120 til 150 °C)

— mindst en af temperaturerne bør være 25 °C eller derunder, hvis dette er teknisk muligt med den valgte metode

— alle originale data

— en kurve over log p som funktion af 1/T

— et beregnet damptryk ved 20 eller 25 °C.

Hvis der iagttages en omdannelse (tilstandsændring, dekomposition), skal følgende oplysninger noteres:

— ændringens art

— den temperatur, ved hvilken ændringen finder sted ved atmosfæretryk

— damptryk ved 10 og 20 °C under omdannelsestemperaturen og 10 og 20 °C over denne temperatur (bortset fra omdannelse fra fast stof til gas).

Alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne, skal rapporteres, specielt hvad angår urenheder og stoffets fysiske tilstand.

3. **LITTERATUR**

(1) *De Europæiske Fællesskabers Tidende* L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

(3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from $10^{-1}$ to $10^{5}$ Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from $10^{-3}$ to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982) 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995) 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87-(12) (1998) 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, Vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

*Tillæg*

**Metode til tilnærmet beregning**

INDLEDNING

Tilnærmede værdier af damptrykket kan anvendes:

— til at afgøre, hvilken testmetode der er velegnet

— til at give et skøn eller en grænseværdi i tilfælde, hvor den eksperimentelle metode af tekniske grunde ikke kan anvendes.

METODE TIL TILNÆRMET BEREGNING

Damptrykket af faste stoffer og væsker kan beregnes tilnærmet med den modificerede Watson-korrelation (a). De eneste eksperimentelle data, der kræves, er det normale kogepunkt. Metoden kan anvendes i hele trykområdet fra $10^5$ Pa til $10^{-5}$ Pa.

Detaljerede oplysninger om metoden findes i »Handbook of Chemical Property Estimation Methods« (b). Se også OECD Environmental Monograph No.67 (c).

BEREGNINGSMETODE

Damptrykket beregnes af følgende udtryk:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b}\right]$$

hvor:

T = den betragtede temperatur

$T_b$ = normalkogepunktet

$P_{vp}$ = damptrykket ved temperaturen T

$\Delta H_{vb}$ = fordampningsvarmen

$\Delta Z_b$ = kompressibilitetsfaktoren (anslået værdi 0,97)

m = en empirisk faktor, der afhænger af den fysiske tilstand ved den betragtede temperatur

Endvidere gælder:

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F\ (8,75 + R \ln T_b)$$

hvor $K_F$ er en empirisk faktor, der tager hensyn til stoffets polaritet. Faktoren $K_F$ er for en række forbindelser af forskellig art angivet i reference (b).

▼**M1**

I mange tilfælde indeholder de foreliggende data en angivelse af kogepunktet ved reduceret tryk. I så fald beregnes damptrykket af følgende udtryk:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{vl}}{\Delta Z_b R T_l}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

hvor $T_1$ er kogepunktet ved det reducerede tryk $P_1$.

RAPPORT

Hvis den tilnærmede beregningsmetode anvendes, skal beregningen være fuldstændig dokumenteret i rapporten.

REFERENCER

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

## A.5. OVERFLADESPÆNDING

### 1. METODE

De beskrevne metoder er baseret på OECD-testvejledningen (1). Grundprincipperne er anført i henvisning (2).

### 1.1. INDLEDNING

De beskrevne metoder anvendes til måling af vandige opløsningers overfladespænding.

Ved udførelsen af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets vandopløselighed, struktur, hydrolyseegenskaber og kritiske koncentrationer for micelledannelse.

De følgende metoder kan anvendes for de fleste kemiske stoffer uanset renheden.

Måling af overfladespænding ved ringtensiometermetoden er begrænset til vandige opløsninger med en dynamisk viskositet på mindre end ca. 200 mPa s.

### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den frie overfladeenthalpi pr. overfladearealenhed betegnes som overfladespændingen.

Overfladespændingen angives i:

N/m (SI-enhed) eller

mN/m (SI-underenhed)

1 N/m = $10^3$ dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm i det gamle cgs-system

### 1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

Referencestoffer, som dækker et bredt udvalg af overfladespændinger, er angivet i henvisning (1) og (3).

### 1.4. METODERNES PRINCIP

Metoderne er baseret på måling af den største kraft, der skal udøves lodret på en stigbøjle eller ring i kontakt med væskeoverfladen af en prøve i et målekar, for at denne kontakt brydes, eller den lodrette kraft, som skal udøves på en plade, hvis ene kant er i kontakt med prøvens overflade, for at den dannede hinde brydes.

Stoffer, hvis opløselighed i vand er mindst 1 mg/l, testes i vandig opløsning ved én koncentration.

### 1.5. KVALITETSKRITERIER

Disse metoder kan give større nøjagtighed, end der må forventes krævet ved miljøvurderinger.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

Der fremstilles en opløsning af stoffet i destilleret vand. Koncentrationen af denne opløsning skal være 90 % af stoffets mætningskoncentration i vand; er denne koncentration større end 1 g/l, benyttes der en koncentration på 1 g/l til testen. Stoffer med en opløselighed i vand på mindre end 1 mg/l behøver ikke at testes.

1.6.1. **Plademetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Stigbøjlemetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Ringmetoden**

Se ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD-harmoniseret ringmetode**

1.6.4.1. *Apparatur*

Kommercielt tilgængelige tensiometre er tilstrækkelige til denne måling. De består af følgende dele:

— bevægeligt prøvebord

— kraftmålingssystem

— målelegeme (ring)

— målekar.

1.6.4.1.1. Bevægeligt prøvebord

Det bevægelige prøvebord anvendes til understøttelse af det termostaterede målekar, som rummer den væske, der skal undersøges. Sammen med kraftmålingssystemet er det monteret på et stativ.

1.6.4.1.2. Kraftmålingssystem

Kraftmålingssystemet (se figuren) er placeret over prøvebordet. Usikkerheden ved kraftmålingen må ikke overstige ± $10^{-6}$ N, svarende til en usikkerhed på ± 0,1 mg ved en vejning. Oftest er måleskalæn på de kommercielt tilgængelige tensiometre inddelt i mN/m, således at overfladespændingen direkte kan aflæses i mN/m med en nøjagtighed på 0,1 mN/m.

▼B

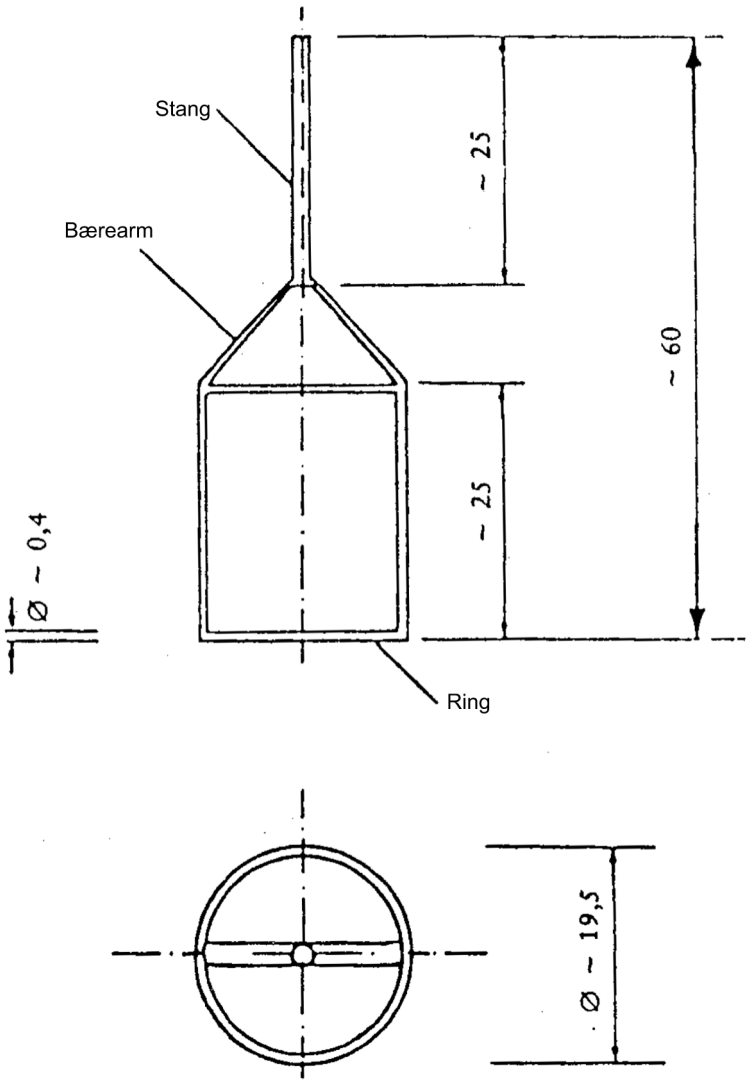
1.6.4.1.3. Målelegeme (ring)

Ringen er sædvanligvis fremstillet af en platin-iridium-tråd med en tykkelse på ca. 0,4 mm og en middelomkreds på 60 mm. Trådringen er ophængt vandret fra en metalstang og en trådbærearm, som danner forbindelsen til kraftmålingssystemet (se figuren).

*Figur*

**Målelegeme**

(alle dimensioner er i mm)




1.6.4.1.4. Målekar

Målekarret, som rummer testopløsningen, skal være et termostateret glaskar. Det skal have en sådan form, at temperaturen af testopløsningen og gasfasen herover er konstant under målingen, og at prøven ikke kan fordampe. Cylindriske glaskar med en indre diameter på mindst 45 mm er acceptable.

▼B

1.6.4.2. *Klargøring af apparatet*

1.6.4.2.1. Rengøring

Glaskar rengøres omhyggeligt. Om nødvendigt vaskes de først med varm chromsvovlsyre og dernæst med en tyktflydende phosphorsyreopløsning (83 til 98 w/w % $H_3PO_4$). Herefter skylles omhyggeligt i ledningsvand og endelig vaskes i redestilleret vand til neutral reaktion. Til sidst tørres karrene, eller de skylles i noget af den prøvevæske, som skal måles.

Ringen renses først grundigt i vand, så alle vandopløselige stoffer fjernes. Derefter nedsænkes den et øjeblik i chromsvovlsyre, skylles i redestilleret vand til neutral reaktion og opvarmes til sidst et øjeblik over en methanolflamme.

*Bemærk:*

Forurening med stoffer, som ikke opløses eller destrueres af chromsvovlsyre eller phosphorsyre, som f.eks. silikoner, fjernes ved hjælp af et passende organisk opløsningsmiddel.

1.6.4.2.2. Kalibrering af apparatet

Apparatet klargøres ved, at nulpunktet justeres, og apparatet indstilles til pålidelig aflæsning i mN/m.

*Opstilling:*

Apparatet skal stilles i vater, f.eks. ved hjælp af et vaterpas på tensiometrets fod, idet man justerer stilleskruerne.

*Nulpunktsindstilling:*

Efter montering af ringen i apparatet, men inden den nedsænkes i væsken, skal tensiometerviseren indstilles på nul, og man kontrollerer, at ringen er parallel med væskeoverfladen. Til dette kan væskeoverfladen anvendes som et spejl.

*Kalibreringer:*

Prøvekalibreringen kan udføres ved en af de følgende to metoder:

a) ved hjælp af lodder: dette er en fremgangsmåde, hvor ryttere af kendt masse mellem 0,1 og 1,0 g anbringes på ringen. Kalibreringsfaktoren $\Phi_a$, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (1).

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

hvor:

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b}(mN/m)$$

m = rytterens masse (g)

g = tyngdeaccelerationen (981 cm $s^{-2}$ ved havoverfladen)

b = ringens middelomkreds (cm)

$\sigma_a$ = tensiometeraflæsningen efter anbringelse af rytteren på ringen (mN/m).

▼B

b) ved hjælp af vand: dette er en fremgangsmåde, hvor der anvendes rent vand, hvis overfladespænding ved f.eks. 23 °C er 72,3 mN/m. Denne fremgangsmåde er hurtigere at udføre end vægtkalibreringen, men der er altid risiko for, at vandets overfladespænding er ændret ved forurening med spor af overfladeaktive stoffer.

Kalibreringsfaktoren, $\Phi_b$, som alle instrumentaflæsninger skal multipliceres med, bestemmes ifølge ligning (2).

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

hvor:

$\sigma_o$ = litteraturværdi for vands overfladespænding (mN/m)

$\sigma_g$ = målt værdi for vands overfladespænding (mN/m) ved samme temperatur

1.6.4.3. *Testforberedelse*

Der fremstilles vandige opløsninger med passende koncentrationer af de stoffer, som skal undersøges. Opløsningerne må ikke indeholde uopløst stof.

Opløsningerne holdes ved konstant temperatur (± 0,5 °C). Idet en opløsnings overfladespænding ændres i målekarret med tiden, må der foretages adskillige målinger på forskellige tidspunkter, og der afsættes en kurve, der viser overfladespændingen som funktion af tiden. Når overfladespændingen ikke ændres yderligere, er ligevægtstilstanden nået.

Støv og gasformig forurening med andre stoffer forstyrrer målingen, hvorfor arbejdet bør udføres under et beskyttende dække.

1.6.5. **Testbetingelser**

Målingerne foretages ved ca. 20 °C, og temperaturen skal holdes inden for ± 0,5 °C.

1.6.6. **Udførelse af testen**

De opløsninger, som skal måles, fyldes i det omhyggeligt rengjorte målekar, idet man undgår skumning. Målekarret anbringes på apparatets prøvebord. Bordet med målekarret hæves, indtil ringen er nedsænket fuldstændigt i den opløsning, som skal måles. Derefter sænkes bordet jævnt og gradvis (med en hastighed på ca. 0,5 cm/min) for at løsrive ringen fra overfladen, indtil den største kraft er nået. Det væskelag, som hænger ved ringen, må ikke fjernes fra denne. Når målingen er udført, nedsænkes ringen atter i væsken, og målingen gentages, indtil der opnås konstante værdier for overfladespændingen. Den tid, der er gået fra overførsel af opløsningen til målekarret og til selve målingen udføres, noteres ved hver bestemmelse. Aflæsningerne skal foretages ved den største kraft, som kræves til løsrivning af ringen fra væskeoverfladen.

▼B

2. **DATA**

For at beregne overfladespændingen skal den værdi, som er aflæst i mN/m på apparatet, først multipliceres med kalibreringsfaktoren $\Phi_a$ eller $\Phi_b$ (afhængigt af den anvendte kalibreringsmetode). Dette giver en værdi, som kun gælder tilnærmelsesvis, og som derfor kræver korrektion.

Harkins og Jordan (4) har empirisk bestemt korrektionsfaktorer for værdier af overfladespændingen, som er bestemt med ringmetoden; disse faktorer afhænger af ringens dimensioner, væskens massefylde og dens overfladespænding.

Da det er besværligt for hver enkelt måling at bestemme korrektionsfaktoren ud fra Harkins og Jordans tabeller for at beregne overfladespænding, kan man for vandige opløsninger benytte en forenklet metode, hvor de korrigerede værdier for overfladespændingen direkte aflæses i den nedenstående tabel (der anvendes interpolation til aflæsninger, som ligger mellem tabelværdierne).

*Tabel*

**Korrektion af den målte overfladespænding**

Kun for vandige opløsninger, p = 1 g/cm$^3$

| | |
|---|---|
| R | = 9,55 mm (gennemsnitlig ringradius) |
| r | = 0,185 mm (ringtrådens radius) |

| Eksperimentel værdi (mN/m) | Korrigeret værdi (mN/m) | |
|---|---|---|
| | kalibrering med lodder (se 1.6.4.2.2. a)) | kalibrering med vand (se 1.6.4.2.2. b)) |
| 20 | 16,9 | 18,1 |
| 22 | 18,7 | 20,1 |
| 24 | 20,6 | 22,1 |
| 26 | 22,4 | 24,1 |
| 28 | 24,3 | 26,1 |
| 30 | 26,2 | 28,1 |
| 32 | 28,1 | 30,1 |
| 34 | 29,9 | 32,1 |
| 36 | 31,8 | 34,1 |
| 38 | 33,7 | 36,1 |
| 40 | 35,6 | 38,2 |
| 42 | 37,6 | 40,3 |
| 44 | 39,5 | 42,3 |
| 46 | 41,4 | 44,4 |
| 48 | 43,4 | 46,5 |
| 50 | 45,3 | 48,6 |
| 52 | 47,3 | 50,7 |
| 54 | 49,3 | 52,8 |
| 56 | 51,2 | 54,9 |

▼B

| Eksperimentel værdi (mN/m) | Korrigeret værdi (mN/m) | |
|---|---|---|
| | kalibrering med lodder (se 1.6.4.2.2. a)) | kalibrering med vand (se 1.6.4.2.2. b)) |
| 58 | 53,2 | 57,0 |
| 60 | 55,2 | 59,1 |
| 62 | 57,2 | 61,3 |
| 64 | 59,2 | 63,4 |
| 66 | 61,2 | 65,5 |
| 68 | 63,2 | 67,7 |
| 70 | 65,2 | 69,9 |
| 72 | 67,2 | 72,0 |
| 74 | 69,2 | — |
| 76 | 71,2 | — |
| 78 | 73,2 | — |

Denne tabel er udarbejdet på basis af Harkins-Jordan korrektioner, og ligner den, der er i DIN-standarden (DIN 53914) for vand og vandige opløsninger (massefylde $\rho = 1\ g/cm^3$) og for en kommerciel tilgængelig ring med dimensionerne R = 9,55 mm (middelringradius) og r = 0,185 mm (ringtrådens radius). Tabellen angiver korrigerede værdier for overfladespændingsmålinger, der er foretaget efter kalibrering med lodder eller vand.

Alternativt kan overfladespændingen uden forudgående kalibrering beregnes efter følgende formel:

$$\sigma = \frac{fxF}{4\pi R}$$

hvor:

F = kraften målt på dynamometeret, idet hinden brydes

R = ringens radius

f = korrektionsfaktoren (1)

## 3. RAPPORTERING

### 3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— anvendt metode

— anvendt type vand eller opløsning

— nøjagtig specifikation af stoffet (identitet og urenheder)

— måleresultater: overfladespænding (aflæsning) med angivelse af både de enkelte målinger, deres middelværdi og den korrigerede middelværdi (med hensyn til apparatfaktoren og korrektionstabellen)

▼B

— opløsningens koncentration

— testtemperaturen

— den anvendte opløsnings alder, og specielt den tid, der er forløbet mellem fremstillingen af opløsningen og målingen

— beskrivelse af overfladespændingens tidsafhængighed efter overførsel til målekarret

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstandsform.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

På baggrund af vands overfladespænding på 72,75 mN/m ved 20 °C anses stoffer med en overfladespænding på mindre end 60 mN/m bestemt ved denne metode for at være overfladeaktive.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV

(3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.

(4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

▼M4

## A.6. VANDOPLØSELIGHED

### INDLEDNING

1. Denne metode svarer til OECD Test Guideline (TG) 105 (1995). Denne metode er en revideret version af den oprindelige TG 105, som blev vedtaget i 1981. Der er ingen indholdsmæssig forskel mellem den nuværende version og versionen fra 1981. Det er primært formatet, som er ændret. Revisionen var baseret på EU-testmetoden »Vandopløselighed« (1).

### INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Et stofs vandopløselighed kan i betragtelig grad afhænge af tilstedeværelsen af urenheder. Metoden omfatter bestemmelse af opløseligheden i vand af stoffer, som i det væsentlige er rene, og som er stabile i vand og ikke flygtige. Inden vandopløseligheden bestemmes, er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om teststoffets strukturformel, damptryk, dissociationskonstant og hydrolyse som funktion af pH.

3. To metoder, kolonne-eluerings-metoden og kolbe-metoden, som omfatter opløselighed henholdsvis under og over $10^{-2}$ g/l, er beskrevet i denne testmetode. En simpel foreløbig test er også beskrevet. Den gør det muligt at bestemme, hvor meget materiale der omtrentligt skal anvendes i den endelige test, og hvor lang tid der omtrentligt kræves til at opnå mætning.

### DEFINITIONER OG ENHEDER

4. Et stofs opløselighed i vand er mætningskoncentrationen af stoffet i vand ved en given temperatur.

5. Opløselighed i vand angives i masse pr. rumfang opløsning. SI-enheden er kg/$m^3$ (g/l kan dog også anvendes).

### REFERENCEKEMIKALIER

6. Anvendelse af referencekemikalier er ikke påkrævet, når et teststof skal undersøges.

### BESKRIVELSE AF METODERNE

**Testbetingelser**

7. Testen udføres helst ved 20 ° C ± 0,5 ° C. Den valgte temperatur bør holdes konstant i alle relevante dele af udstyret.

**Indledende test**

8. Stigende mængder vand tilsættes trinvist ved stuetemperatur til ca. 0,1 g af prøven (faste teststoffer skal være pulveriserede) i et 10 ml måleglas med glasprop. Efter hver tilsætning af vand omrystes blandingen kraftigt i 10 minutter, og det undersøges visuelt, om der er noget uopløst af prøven tilbage. Hvis prøven eller dele af prøven forbliver uopløst, efter at der er tilsat 10 ml vand, fortsættes testen i et 100 ml måleglas. Den anslåede opløselighed er angivet i tabel 1 nedenfor under den mængde tilsat vand,

▼M4

der netop forårsagede en fuldstændig opløsning af prøven. Hvis opløseligheden er lav, kan det tage lang tid at opløse et teststof, og henstandstiden øges til mindst 24 timer. Hvis teststoffet stadig ikke er opløst efter 24 timer, øges henstandstiden yderligere (op til 96 timer), eller der foretages yderligere fortynding, så det kan afgøres, om kolonne-eluerings- eller kolbe-metoden skal anvendes.

*Tabel 1*

| ml vand til 0,1 g opløseligt stof | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 10 | 100 | > 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| omtrentlig opløselighed i g/l | > 1 000 | 1 000 til 200 | 200 til 100 | 100 til 50 | 50 til 10 | 10 til 1 | < 1 |

**Kolonne-eluerings-metoden**

*Princip*

9. Denne metode er baseret på eluering af teststoffet med vand fra en mikrokolonne, der indeholder et inert bæremateriale, som er belagt med overskud af teststoffet (2). Opløseligheden i vand angives ved massekoncentrationen i eluatet, når den har nået et plateau som en funktion af tiden.

*Apparatur*

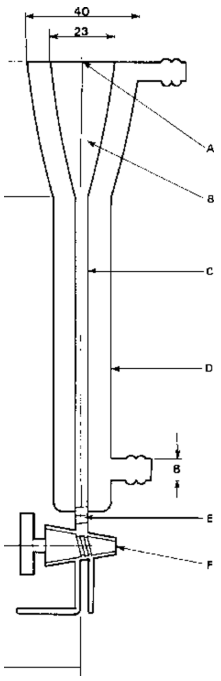
10. Apparaturet består af en mikrokolonne (figur 1), som holdes ved konstant temperatur. Den er forbundet til en recirkulationspumpe (figur 2) eller en niveaubeholder (figur 3). Mikrokolonnen indeholder et inert bæremateriale, som holdes på plads af en lille prop af glasuld, der også fungerer som filter for partikler. Mulige materialer, der kan anvendes som bærematerialе, er glaskugler, diatoméjord eller andet inert materiale.

11. Mikrokolonnen i figur 1 kan anvendes til konfigurationen med recirkulationspumpe. Den har et headspace, der sikrer plads til fem bed-rumfang (som kasseres ved begyndelsen af testen) og rumfanget af fem prøver (som udtages til analyse under testen). Alternativt kan størrelsen reduceres, hvis vand kan tilsættes systemet under testen som erstatning for de første fem bed-rumfang, der fjernes med urenheder. Kolonnen tilsluttes med slange fremstillet af et inert materiale til recirkulationspumpen, som kan levere ca. 25 ml/h. Recirkulationspumpen kan f.eks. være en slangepumpe eller en membranpumpe. Det skal omhyggeligt sikres, at der ikke sker kontaminering af og/eller adsorption på slangematerialet.

12. Et system med niveaubeholder er vist skematisk i figur 3. I dette system er mikrokolonnen udstyret med en envejsstophane. Tilslutningen til niveaubeholderen består af en glasslibforbindelse og slange fremstillet af et inert materiale. Flowhastigheden fra niveaubeholderen bør være ca. 25 ml/h.

▼**M4**

*Figur 1*




Mål i mm

A. Forbindelse til glasslib

B. Headspace

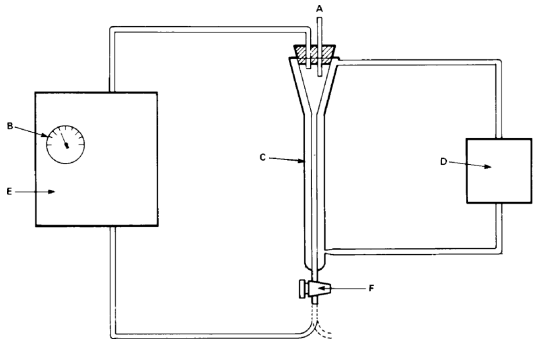
C. Indvendig: 5

D. Udvendig: 19

E. Glasuldsprop

F. Stophane

*Figur 2*




A. Ligevægt til atmosfæren

B. Flowmeter

C. Mikrokolonne

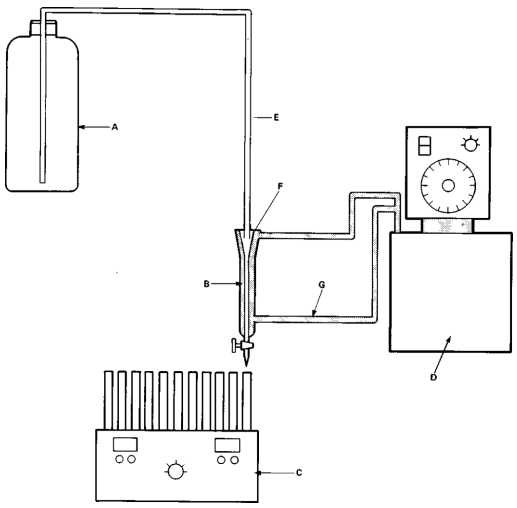
D. Termostatstyret cirkulationspumpe

E. Recirkulationspumpe

F. Tovejshane til prøveudtagning

▼**M4**

*Figur 3*




A. Niveaubeholder (f.eks. 2,5 l standflaske)

B. Kolonne

C. Fraktionssamler

D. Termostat

E. Teflonslange

F. Glasslibforbindelse

G. Vandslange (mellem termostat og kolonne, indre diameter: ca. 8 mm)

13. Ca. 600 mg bæremateriale overføres til en 50 ml rundbundet kolbe. En passende mængde af teststoffet opløses i et flygtigt opløsningsmiddel af analysekvalitet, og en passende mængde af denne opløsning tilsættes bæremateriale. Opløsningsmidlet afdampes fuldstændigt, f.eks. i en rotationsfordamper, da bæremateriale ellers ikke kan vandmættes i elueringstrinnet som følge af fordelingseffekter på overfladen. Det behandlede bæremateriale henstilles til kvældning i to timer i ca. 5 ml vand, hvorefter suspensionen overføres til mikrokolonnen. Alternativt kan det tørre behandlede bæremateriale hældes i mikrokolonnen, der er fyldt med vand, og derefter henstå i ca. to timer til opnåelse af ligevægt.

14. Afsætningen på bæremateriale kan give problemer, der kan føre til fejlagtige resultater, f.eks. hvis teststoffet afsættes som en olie. Sådanne problemer bør undersøges, og detaljerne bør rapporteres.

*Fremgangsmåde baseret på recirkulationspumpe*

15. Væskestrømmen gennem kolonnen startes. Det anbefales at bruge en flowhastighed på ca. 25 ml/h, hvilket svarer til ca. 10 bed-rumfang pr. time for den beskrevne kolonne. Som minimum kasseres de første fem bed-rumfang, så vandopløselige urenheder fjernes. Derefter køres pumpen, indtil der er opnået ligevægt, defineret ved, at fem på hinanden følgende prøver giver koncentrationer, der ikke afviger mere end ± 30 % på tilfældig måde. Disse prøver bør være adskilt fra hinanden ved tidsintervaller, der svarer til et gennemløb af mindst 10 bed-rumfang. Afhængigt af den anvendte analysemetode kan det med fordel påvises ved hjælp af en kurve over koncentration/tid, at ligevægt er opnået.

▼M4

*Fremgangsmåde baseret på niveaubeholder*

16. Successive fraktioner af eluatet opsamles og analyseres ved hjælp af den valgte metode. Fraktioner fra det midterste elueringsområde, hvor koncentrationerne er konstante inden for ± 30 % i mindst fem på hinanden følgende prøver, anvendes til at bestemme opløseligheden.

17. Dobbeltdestilleret vand er den foretrukne eluent. Deioniseret vand med en modstand over 10 megohm/cm og et samlet indhold af organisk kulstof under 0,01 % kan også anvendes.

18. Ved begge fremgangsmåder udføres endnu et forsøg med halvt så høj flowhastighed som det første. Hvis resultaterne fra de to forsøg stemmer overens, er testen tilfredsstillende. Hvis den målte opløselighed er højere ved den lavere flowhastighed, skal halveringen af flowhastigheden fortsættes, indtil to på hinanden følgende forsøg giver samme opløselighed.

19. Ved begge fremgangsmetoder kontrolleres fraktionerne for tilstedeværelse af kolloidt materiale ved hjælp af Tyndall-effekten. Tilstedeværelse af partikler gør testen værdiløs, og den bør gentages efter forbedring af kolonnens filtreringsfunktion.

20. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

**Kolbe-metoden**

*Princip*

21. Teststoffet opløses (faste stoffer skal være pulveriserede) i vand ved en temperatur noget over testtemperaturen. Når mætning er opnået, afkøles blandingen og opbevares ved testtemperatur. Hvis det ved passende prøvetagning i øvrigt sikres, at mætningsligevægten er nået, kan målingen foretages direkte ved testtemperaturen. Derefter bestemmes massekoncentrationen af teststoffet i den vandige opløsning, der ikke må indeholde uopløste partikler, ved hjælp af en passende analysemetode (3).

*Apparatur*

22. Der er behov for følgende materialer:

— normalt laboratorieglasudstyr og -instrumentering

— udstyr til rystning/omrøring af opløsninger ved kontrolleret konstant temperatur

— eventuelt en centrifuge (helst termostateret) til emulsioner og

— analyseudstyr.

*Fremgangsmåde*

23. Den mængde teststof, der er nødvendig for at mætte det ønskede rumfang vand, anslås ud fra den foreløbige test. Ca. fem gange denne mængde stof afvejes i hver af tre glasbeholdere med glasprop (f.eks. centrifugeglas eller kolber). En mængde vand, der er bestemt ved hjælp af analysemetoden og opløselighedsområdet, tilsættes hver beholder. Beholderne lukkes tæt til og omrystes ved 30 °C. Der anvendes ryste- eller omrørerudstyr, som kan operere ved konstant temperatur, f.eks. magnetomrøring i et termostatbad. Efter en dag henstilles én af beholderne til opnåelse af ligevægt i 24 timer ved testtemperaturen, og den rystes lejlighedsvis. Indholdet i beholderen centrifugeres derefter ved testtemperaturen, og koncentrationen af teststoffet i den klare vandige fase bestemmes med en passende analysemetode. De

▼M4

andre to kolber behandles på samme måde efter forudgående opnåelse af ligevægt ved 30 °C i henholdsvis to og tre dage. Hvis de koncentrationer, der måles i mindst to af beholderne, ikke adskiller sig med mere end 15 %, er testen tilfredsstillende. Hvis resultaterne fra beholder 1, 2 og 3 viser en stigende tendens, gentages hele testen med længere tider til opnåelse af ligevægt.

24. Testen kan også udføres uden forudgående henstand ved 30 °C. Der opnås et skøn over, hvor hurtigt mætningsligevægten indstiller sig, ved udtagning af prøver, indtil omrøringstiden ikke længere indvirker på de målte koncentrationer.

25. pH i alle prøver måles, helst ved hjælp af særligt indikatorpapir.

**Analytiske bestemmelser**

26. Der foretrækkes en stofspecifik analysemetode, eftersom små mængder af opløselige urenheder kan forårsage store fejl i den målte opløselighed. Eksempler på sådanne metoder omfatter gas- eller væskekromatografi, titrering, fotometri og voltametri.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

*Kolonne-eluerings-metoden*

27. For hvert forsøg udregnes middelværdien og standardafvigelsen for mindst fem på hinanden følgende prøver udtaget ved mætningsplateauet. Forskellen mellem middelværdierne fra to test med forskellige flowhastigheder må ikke være større end 30 %.

*Kolbe-metoden*

28. Der beregnes et gennemsnit af de enkelte resultater fra hver af de tre kolber, og forskellen mellem dem må ikke være større end 15 %.

**Testrapport**

*Kolonne-eluerings-metoden*

29. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)

— koncentration, flowhastighed og pH for hver enkelt prøve

— middelværdi og standardafvigelse for mindst fem prøver fra mætningsplateauet fra hvert forsøg

— gennemsnittet af to successive, acceptable forsøg

— vandtemperaturen under mætningsprocessen

— analysemetoden

— arten af det anvendte bæremateriale

— afsætning på bærematerialet

— anvendt opløsningsmiddel

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

▼**M4**

*Kolbe-metoden*

30. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— resultaterne af den foreløbige test

— kemisk identitet og kemiske urenheder (eventuelle indledende rensningstrin)

— de enkelte analyseresultater og gennemsnittet, når der er bestemt mere end én værdi for hver kolbe

— pH af hver enkelt prøve

— gennemsnittet af værdierne for de forskellige kolber, der stemte overens

— testtemperaturen

— analysemetoden

— tegn på eventuel kemisk ustabilitet af stoffet under testen

— alle oplysninger af betydning for vurdering af resultaterne, især vedrørende urenheder og teststoffets fysiske tilstandsform.

*LITTERATUR:*

(1) Bilag til Kommissionens direktiv 92/69/EØF af 31. juli 1992 om syttende tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer, EFT L 383 A af 29.12.1992, s. 54.

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use -Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

## A.8. FORDELINGSKOEFFICIENT

### 1. METODE

Den beskrevne »rystekolbemetode« er baseret på OECD-testvejledningen (1).

### 1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets strukturformel, dissociationskonstant, vandopløselighed, hydrolyse, opløselighed i n-octanol og overfladespænding.

Målinger på ioniserbare stoffer udføres på den ikke-ioniserede form (fri syre eller fri base) dvs. ved anvendelse af en passende buffer med en pH-værdi på mindst 1 enhed under (fri syre) eller over (fri base) stoffets pK-værdi.

Testmetoden omfatter to særskilte fremgangsmåder — rystekolbemetoden og højtydende væskekromatografi (HPLC). Førstnævnte er brugbar, når værdien af log Pow (se definitionerne nedenfor) ligger mellem — 2 og 4, og sidstnævnte i området mellem 0 og 6. Førend nogen af fremgangsmåderne påbegyndes, foretages der er foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten.

Rystekolbemetoden kan kun benyttes for stoffer, der i alt væsentligt er rene, og som er opløselige i vand og n-octanol. Den kan ikke anvendes til overfladeaktive materialer (for hvilke der anføres en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand).

HPLC-metoden kan ikke benyttes til stærke syrer og baser, metalkomplekser, overfladeaktive stoffer og stoffer, der reagerer med elueringsmidlet. For sådanne materialer anføres der en beregnet værdi eller et skøn baseret på opløseligheden i henholdsvis n-octanol og vand.

HPLC-metoden er mindre følsom end rystekolbemetoden over for urenheder i teststoffet. Ikke desto mindre kan urenheder i visse tilfælde vanskeliggøre fortolkningen af resultaterne på grund af usikker tilforordning af toppene. For blandinger med et uopløst bånd anføres en øvre og nedre grænse for log P.

### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Fordelingkoefficienten (P) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne ($c_i$) af et stof, der er opløst i et tofasesystem bestående af to stort set ublandbare opløsningsmidler. I tilfældet n-octanol og vand:

$$p_{ow} = \frac{c_n - \text{octanol}}{c_{vand}}$$

Fordelingskoefficienten (P) er derfor et forhold mellem to koncentrationer og opgives ofte som titalslogaritmen (log P).

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

*Rystekolbemetoden*

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

*HPLC-metoden*

For at kunne korrelere målte HPLC-data for et stof med dets P-værdi må der fastlægges en kalibreringskurve for log P mod kromatografiske data, som er baseret på mindst seks referencepunkter. Det er op til brugeren at vælge de egnede referencestoffer. Så vidt muligt skal der være mindst ét referencestof med en $P_{ow}$-værdi, der ligger over teststoffets, og mindst ét med en $P_{ow}$-værdi under teststoffets. For værdier af log P under 4 kan kalibreringen baseres på data opnået med rystekolbemetoden. For værdier af log P over 4 kan kalibreringen baseres på validerede litteraturværdier, hvis de stemmer overens med beregnede værdier. Af hensyn til nøjagtigheden anbefales at vælge referencestoffer, der strukturmæssigt ligner teststoffet.

Der foreligger omfattende lister med værdier for log $P_{ow}$ for mange grupper af kemikalier (2)(3). Hvis der ikke foreligger data om fordelingskoefficienter for strukturmæssigt beslægtede stoffer, kan der bruges en mere generel kalibrering foretaget med andre referencestoffer.

Der er i tillæg 2 en liste over anbefalede referencestoffer og deres $P_{ow}$-værdier

1.4. METODENS PRINCIP

1.4.1. **Rystekolbemetoden**

For at kunne bestemme fordelingskoefficienten må der opnås ligevægt mellem alle komponenterne i systemet, og koncentrationerne af de i de to faser opløste stoffer må bestemmes. En gennemgang af litteraturen herom har vist, at der kan benyttes en række forskellige teknikker til at løse dette problem, dvs. omhyggelig blanding af de to faser og bestemmelse af ligevægtskoncentrationen af det undersøgte stof efter adskillelse af faserne.

1.4.2. **HPLC-metoden**

HPLC udføres på analytiske kolonner pakket med en kommercielt tilgængelig fast fase indeholdende lange kulbrintekæder (f.eks. $C_8$, $C_{18}$) kemisk bundet til silica. Indsprøjtes der kemikalier på en sådan kolonne, vil de vandre gennem den med forskellig hastighed, da deres fordeling mellem den mobile fase og den stationære kulbrintefase ikke er den samme. Kemikalieblandinger elueres i rækkefølge efter hydrofobicitet, idet de vandopløselige kemikalier elueres først og de olieopløselige sidst, alt efter deres kulbrinte/vand-fordelingskoefficient. Derved kan sammenhængen mellem retentionstiden på en sådan kolonne (med omvendt fase) og n-octanol/vand-fordelingskøfficienten fastslås. Fordelingskoefficienten udledes af kapacitetsfaktoren k, der er givet ved udtrykket:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

hvor $t_r$ er teststoffets retentionstid og $t_o$ er den tid, et opløsningsmiddelmolekyle i gennemsnit bruger på at komme gennem kolonnen (kolonnens dødtid).

Der kræves ikke kvantitative analysemetoder, og det er kun nødvendigt at bestemme retentionstiderne.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

*Rystekolbemetoden*

For at opnå en tilstrækkeligt nøjagtig fordelingskoefficient foretages der dobbeltbestemmelse under tre forskellige testbetingelser, hvor både stofmængden og forholdet mellem opløsningsmidlerne kan varieres. De fundne værdier af fordelingskoefficienten skal, når de udtrykkes som titalslogaritmer, ligge inden for et interval på ± 0,3.

*HPLC-metoden*

For at øge tilliden til målingen foretages der dobbeltbestemmelse. Værdier af log P beregnet ud fra de enkelte målinger skal ligge inden for et interval på ± 0,1.

1.5.2. **Følsomhed**

*Rystekolbemetoden*

Metodens måleområde afgrænses af analysemetodens påvisningsgrænse. Den skal tillade bestemmelse af værdier for log $P_{ow}$ i området fra 2 til 4 (under visse omstændigheder op til 5), når koncentrationen af opløst stof ikke er større end 0,01 mol pr. liter i nogen af faserne.

*HPLC-metoden*

Med HPLC-metoden kan der skønnes fordelingskoefficienter i log $P_{ow}$-området fra 0 til 6.

Normalt kan en forbindelses fordelingskoefficient skønnes med en afvigelse på mindre end ± 1 fra den værdi, der opnås med rystekolbemetoden. Typiske korrelationer fremgår af henvisning (4)(5)(6)(7)(8). Der kan normalt opnås større nøjagtighed, hvis der anvendes korrelationskurver bestemt med strukturmæssigt beslægtede referencestoffer (9).

▼B

1.5.3. **Specificitet**

*Rystekolbemetoden*

Nernsts fordelingslov gælder kun for fortyndede opløsninger ved konstant temperatur, tryk og pH. Den gælder kun for et enkelt stof, der er fordelt mellem to rene opløsningsmidler. Hvis der forekommer flere opløste stoffer i den ene eller i begge faser samtidig, kan dette påvirke resultaterne.

Dissociering eller associering af de opløste molekyler resulterer i afvigelser fra Nernsts fordelingslov. At fordelingskoefficienten afhænger af opløsningens koncentration er tegn på en sådan afvigelse.

På grund af de mange involverede ligevægte, må metoden ikke anvendes på ioniserbare stoffer uden korrektion. For sådanne stoffer kan det overvejes at benytte bufferopløsninger i stedet for vand; i så fald skal bufferens pH ligge mindst 1 enhed fra stoffets pKa, og dette pH's relevans for miljøet skal overvejes

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Indledende skøn over fordelingskoefficienten**

Der kan dannes et skøn over fordelingskoefficienten enten ved beregning (se tillæg 1), hvilket foretrækkes, eller i givet fald ud fra teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler (10).

1.6.2. **Rystekolbemetoden**

1.6.2.1. *Forberedelser*

n-octanol: bestemmelsen af fordelingskoefficienten udføres med reagenser af analysekvalitet.

vand: der anvendes vand, som er destilleret eller dobbeltdestilleret i glas- eller kvartsapparatur. Til ioniserbare forbindelser benyttes der bufferopløsninger i stedet for vand, hvis der er gode grunde hertil.

*Bemærk:*

Der må ikke bruges vand taget direkte fra en ionbytter.

1.6.2.1.1. Formætning af opløsningsmidlerne

Før en fordelingskoefficient bestemmes, mættes hver af de faser, der indgår i opløsningsmiddelsystemet, med den anden fase ved rystning ved forsøgstemperaturen. Hertil er det praktisk at ryste to store standflasker med henholdsvis n-octanol af analysekvalitet og vand med tilstrækkelig meget af det andet opløsningsmiddel på et mekanisk rysteapparat i 24 timer, og derefter lade dem henstå så længe, at faserne skiller og der er opnået mætning.

▼B

1.6.2.1.2. Forberedelse af testen

Testbeholderen skal være næsten helt fyldt af tofasesystemet. Derved hindres materialetab ved fordampning. Stofmængder og volumenforhold fastlægges på grundlag af:

— det foreløbige skøn over fordelingskoefficienten (se ovenfor)

— den mængde teststof, der mindst kræves til analysen

— en øvre koncentrationsgrænse på 0,01 mol/l for begge faser.

Der udføres tre test. I den første bruges det beregnede volumenforhold mellem n-octanol og vand; i den anden divideres dette forhold med 2, og i det tredje multipliceres det med 2 (f.eks. 1:1, 1:2 og 2:1).

1.6.2.1.3. Teststof

Der fremstilles en stamopløsning i n-octanol, der på forhånd er mættet med vand. Denne stamopløsnings koncentration bestemmes nøjagtigt, inden den anvendes til bestemmelse af fordelingskoefficienten. Den opbevares under betingelser, hvor den er stabil.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testtemperaturen skal holdes konstant (± 1 °C) og ligge mellem 20 og 25 °C.

1.6.2.3. *Fremgangsmåde ved målingen*

1.6.2.3.1. Opnåelse af fordelingsligevægt

For hver af testbetingelserne benyttes der to testbeholdere, der hver indeholder den nødvendige nøjagtigt afmålte mængde af de to opløsningsmidler og den nødvendige mængde stamopløsning.

n-octanolfaserne afmåles volumetrisk. Testbeholderne kan enten anbringes i et egnet rysteapparat eller rystes i hånden. Når et centrifugeglas benyttes, anbefales en hurtig 180° drejning om tværaksen af glasset, hvorved den indespærrede luft stiger op gennem de to faser. Erfaringen viser, at 50 sådanne drejninger normalt er tilstrækkeligt til, at fordelingsligevægten indtræder. For en sikkerheds skyld anbefales det at foretage 100 drejninger i løbet af 5 minutter.

1.6.2.3.2. Faseadskillelse

Blandingen kan om nødvendigt centrifugeres, så faserne adskilles. Det gøres i en laboratoriecentrifuge ved stuetemperatur; hvis der benyttes en centrifuge uden temperaturregulering, henstår centrifugeglassene i én time ved testtemperaturen til opnåelse af ligevægt før analyse.

▼B

1.6.2.4. *Analyse*

Til bestemmelse af fordelingskoefficienten må koncentrationen af teststoffet i begge faser bestemmes. Det kan gøres ved, at der for hver testbetingelse udtages en delprøve af hver fase fra hvert glas, som analyseres ved den valgte metode. Den samlede mængde stof i begge faser beregnes og sammenlignes med den oprindeligt tilsatte stofmængde.

Prøven af vandfasen udtages på en sådan måde, at risikoen for, at den indeholder spor af n-octanol, bliver minimal, nemlig med en glasinjektionssprøjte. Fra starten skal sprøjten være delvis fyldt med luft, som langsomt trykkes ud, medens kanylen føres ned gennem n-octanollaget. En passende mængde af vandfasen suges op i sprøjten, som hurtigt trækkes op af opløsningen, og kanylen fjernes. Sprøjtens indhold kan nu benyttes som den vandige prøve. Koncentrationen i de to adskilte faser skal helst bestemmes ved en stofspecifik metode. Eksempelvis er følgende analysemetoder egnede:

— fotometriske metoder

— gaskromatografi

— højtydende væskekromatografi (HPLC).

1.6.3. **HPLC-metoden**

1.6.3.1. *Forberedelser*

*Apparatur*

Der kræves en væskekromatograf med pulsationsfri pumpe og passende detektionssystem. Det anbefales at bruge injektionsventil med injektionsspiral. Polære grupper i den stationære fase kan nedsætte HPLC-kolonnens ydeevne væsentligt. Derfor må stationære faser have det lavest mulige procentindhold af polære grupper (11). Der kan anvendes kommercielle mikroniserede pakkematerialer med omvendt fase eller færdigpakkede kolonner. Der kan eventuelt anbringes en beskyttelseskolonne mellem injektionssystemet og analysekolonnen.

*Mobil fase*

Der anvendes methanol og vand af HPLC-kvalitet til fremstilling af elueringsvæsken, som afgasses før brugen. Der benyttes isokratisk eluering. Den anvendte methanol/vand-blanding skal indeholde mindst 25 % vand. Til eluering af forbindelser med en log P på 6 på én time ved en flowhastighed på 1 ml/min vil en blanding af methanol og vand i forholdet 3:1 (v/v) typisk være tilfredsstillende. For forbindelser med en høj log P-værdi kan det være nødvendigt at nedsætte elueringstiden (også for referencestofferne) ved at benytte en mindre polær mobil fase eller en kortere kolonne.

Stoffer med meget lav opløselighed i n-octanol har tendens til at give unormalt lave værdier for log $P_{ow}$ med HPLC-metoden; undertiden følger sådanne forbindelsers toppe opløsningsmiddelfronten. Dette skyldes sandsynligvis, at fordelingsprocessen er for langsom til, at der opnås ligevægt inden for den tid, en HPLC-adskillelse normalt tager. I så fald kan nedsættelse af flowhastigheden og/eller mindskelse af methanol/vand-forholdet være et virkningsfuldt middel til at opnå en pålidelig værdi.

▼B

Både teststof og referencestoffer skal være opløselige i den mobile fase i en så høj koncentration, at de kan påvises. Der må kun undtagelsesvis benyttes tilsætningsstoffer til methanol/vand-blandingen, da tilsætningsstoffer vil ændre kolonnens egenskaber. Til kromatogrammer med tilsætningsstoffer skal der altid anvendes en separat kolonne af samme type. Hvis methanol/vand ikke er egnet, kan der anvendes andre blandinger af vand og organiske opløsningsmidler, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand.

For ioniserbare stoffer er elueringsvæskens pH kritisk. Det skal ligge inden for kolonnens driftsområde, som normalt er fra 2 til 8. Det anbefales at anvende buffer. Man må være omhyggelig med at undgå saltudfældning og ødelæggelse af kolonnen, hvilket kan forekomme med visse blandinger af organisk fase og buffer. Det tilrådes ikke at foretage HPLC-målinger med silicabaserede stationære faser med pH over 8, da alkalisk mobil fase kan føre til, at kolonnens ydeevne hurtigt falder.

*Opløste stoffer*

Referencestoffer skal være af renest mulige kvalitet. Til testnings- og kalibreringsformål opløses stofferne om muligt i den mobile fase.

*Testningsbetingelser*

Under målingen må temperaturen ikke variere med mere end ± 2 K.

1.6.3.2. ***Måling***

*Beregning af dødtiden $t_o$*

Dødtiden $t_o$ kan bestemmes enten med en homolog række (f.eks. n-alkylmethylketoner) eller med organiske stoffer, der ikke holdes tilbage (f.eks. thiourinstof eller formamid). Til beregning af dødtiden $t_o$ ud fra en homolog række, indsprøjtes der mindst syv elementer af en homolog række, og retentionstiderne bestemmes. Bruttoretentionstiderne $t_{r\,(n\,c\,+\,1)}$ afbildes mod $t_{r(n\,c),}$ og i regressionsligningen:

$$t_{r\,(n\,c\,+\,1)} = a + b\ t_{r\,(n\,c)}$$

bestemmes afskæringen a og hældningskoefficienten b ($n_c$ = antallet af kulstofatomer). Dødtiden er da givet ved:

$$t_o = a/(1 - b)$$

▼B

*Kalibreringskurve*

Næste trin består i at konstruere en korrelationskurve af log k mod log P for passende referencestoffer. I praksis indsprøjtes der samtidig mellem fem og ti standardreferencestoffer, hvis log P ligger i det forventede område, og retentionstiderne bestemmes, helst med en integrationsskriver, der er koblet til detektionssystemet. De tilsvarende logaritmer til kapacitetsfaktorerne, log k, beregnes og afsættes mod den log P, der er bestemt ved rystekolbemetoden. Kalibreringen foretages regelmæssigt, mindst én gang dagligt, så der kan tages højde for eventuelle ændringer i kolonnens ydeevne.

*Bestemmelse af teststoffets kapacitetsfaktor*

Teststoffet indsprøjtes som en så lille mængde mobil fase som mulig. Retentionstiden bestemmes (dobbeltbestemmelse), hvorved kapacitetsfaktoren k kan beregnes. Ud fra korrelationskurven over referencestofferne kan teststoffets fordelingskoefficient interpoleres. Ved meget lave og meget høje fordelingskoefficienter er det nødvendigt at ekstrapolere. I sådanne tilfælde må man være særlig opmærksom på regressionslinjens konfidensgrænser.

2. **DATA**

*Rystekolbemetoden*

De målte P-værdiers pålidelighed kan kontrolleres ved sammenligning af gennemsnittet af dobbeltbestemmelserne med det samlede gennemsnit.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en beregnet værdi eller et skøn baseret på de enkelte opløseligheder, hvis metoderne ikke kan anvendes (f.eks. overfladeaktivt materiale)

— alle oplysninger og bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne især vedrørende urenheder og stoffets fysiske tilstand.

*For rystekolbemetoden:*

— resultatet af et eventuelt indledende skøn

— den temperatur, som bestemmelsen er foretaget ved

— data om de analysemetoder, der er benyttet til koncentrationsbestemmelser

— eventuel centrifugeringstid og -hastighed

▼B

— målte koncentrationer i begge faser for hver bestemmelse (der skal således rapporteres i alt 12 koncentrationer)

— massen af teststof, det anvendte volumen af hver fase i hver testbeholder og den samlede beregnede mængde teststof i hver fase efter indstilling af ligevægt

— den beregnede værdi for fordelingskoefficienten (P) og gennemsnittet for hvert sæt testbetingelser samt gennemsnittet af samtlige bestemmelser. Eventuelle tegn på, at fordelingskoefficienten er koncentrationsafhængig anføres i rapporten

— de enkelte P-værdiers standardafvigelse fra gennemsnittet

— gennemsnitsværdien af P fra alle bestemmelser anføres tillige som titalslogaritmen

— den beregnede teoretiske værdi af $P_{ow}$, når denne værdi er bestemt eller når den målte værdi er $> 10^4$

— pH af det anvendte vand og af vandfasen under forsøget

— begrundelse for anvendelse af buffere i stedet for vand, deres sammensætning, koncentration og pH, samt vandfasens pH før og efter forsøget.

*For HPLC-metoden:*

— resultatet af et eventuelt foreløbigt skøn

— test- og referencestoffer og deres renhedsgrad

— det temperaturinterval, som bestemmelserne er foretaget ved

— det pH, som bestemmelserne er foretaget ved

— detaljerede oplysninger om analyse- og beskyttelseskolonne, mobil fase og detektionssystem

— retentionsdata og litteraturværdier for log P for referencestoffer benyttet ved kalibrering

— detaljerede oplysninger om den fittede regressionslinje (log k mod log P)

— gennemsnitlige retentionsdata og interpoleret log P-værdi for teststoffet

— beskrivelse af udstyr og driftsbetingelser

— elueringsprofiler

— den mængde test- og referencestof, der er indført i kolonnen

— dødtiden og hvordan den er målt.

▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.

(19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base1, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

*Tillæg 1*

**Metoder til beregning/estimering**

**INDLEDNING**

I Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) er der en generel indføring i beregningsmetoder samt data og eksempler.

Beregnede værdier for $P_{ow}$ kan benyttes:

— til at afgøre, hvilken forsøgsmetode der er mest velegnet (rystekolbemetoden: log $P_{ow}$ — 2 til 4; HPLC-metoden: log $P_{ow}$ 0 til 6)

— til at vælge de bedste forsøgsbetingelser (f.eks. referencestoffer til HPLC-metoden og volumenforholdet mellem n-octanol og vand til rystekolbemetoden)

— som intern laboratoriekontrol for eventuelle forsøgsfejl

— til at give et skøn over $P_{ow}$ i de tilfælde, hvor man af tekniske årsager ikke kan anvende eksperimentelle metoder.

**ESTIMERINGSMETODER**

*Foreløbigt skøn over fordelingskoefficienten*

Der kan foretages et skøn over værdien af fordelingskoefficienten ved hjælp af teststoffets opløselighed i de rene opløsningsmidler: Hertil benyttes:

$$P_{estimate} = \frac{\text{saturation } c_{n-octanol}}{\text{saturation } c_{water}}$$

**BEREGNINGSMETODER**

*Princippet bag beregningsmetoderne*

Alle beregningsmetoder er baseret på formel fragmentering af molekylet i passende delstrukturer, for hvilke man har pålideligt kendskab til log $P_{ow}$-bidrag. Log $P_{ow}$ for hele molekylet beregnes dernæst som summen af fragmentværdierne plus summen af korrektionsudtryk for intramolekylære vekselvirkninger.

Der foreligger lister over fragmentkonstanter og korrektionsudtryk (b)(c)(d)(e). Nogle af dem ajourføres regelmæssigt (b).

**Kvalitetskriterier**

Sædvanligvis aftager beregningsmetodens pålidelighed med, at det undersøgte stofs kompleksitet stiger. For simple molekyler med lav molekylvægt og en eller to funktionelle grupper kan der forventes en afvigelse på 0,1 til 0,3 mellem resultatet af forskellige fragmenteringsmetoder og den målte værdi for log $P_{ow}$. Fejlmargenen kan være større for mere komplekse molekyler. Den afhænger af, om der foreligger fragmentkonstanter og hvor pålidelige de er, samt af, om intramolekylære vekselvirkninger (f.eks. hydrogenbindinger) erkendes, og om korrektionsudtrykkene anvendes korrekt (mindre problematisk med computerprogrammet CLOGP-3) (b). For ioniserbare forbindelsers vedkommende har det stor betydning, at ladningen eller ioniseringsgraden bedømmes korrekt.

▼B

**Fremgangsmåde ved beregningen**

*Hanschs π-metode*

Den oprindelige konstant for hydrofobe substituenter, π, som indførtes af Fujita m.fl. (f), defineres ved

$$\pi_x = \log P_{ow} (PhX) - \log P_{ow} (PhH)$$

hvor $P_{ow}$ (PhX) er fordelingskoefficienten for et aromatisk derivat og $P_{ow}$(PhH) er stamforbindelsens fordelingskoefficient

(f.eks. $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Ifølge sin definition gælder π-metoden navnlig for aromatisk substitution. Der findes tabeller med π-værdier for en lang række substituenter (b)(c)(d). De benyttes til beregning af log $P_{ow}$ for aromatiske molekyler og delstrukturer.

*Rekkers metode*

Efter Rekker (g) beregnes værdien af log $P_{ow}$ således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{vekselvirkningsudtryk})$$

hvor $f_i$ er de forskellige molekylfragmentkonstanter og $a_i$ er den hyppighed, hvormed de forekommer i det pågældende molekyle. Korrektionsudtrykkene kan udtrykkes som et heltalsmultiplum af én enkelt konstant $C_m$ (den såkaldte »magiske konstant«). Fragmentkonstanterne $f_i$ og $C_m$ er bestemt på grundlag af en liste med 1 054 eksperimentelt bestemte værdier af $P_{ow}$ (825 forbindelser) ved hjælp af flerdimensional regressionsanalyse (c)(h). Vekselvirkningsudtrykkene bestemmes efter faste regler, der er beskrevet i henvisning (e)(h)(i).

*Hansch-Leos metode*

Efter Hansch og Leo (c) beregnes værdien af log $P_{ow}$ således:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

hvor $f_i$ er de forskellige molekylfragmentkonstanter, $F_j$ er korrektionsudtrykkene, og $a_i$, og $b_j$ er de hertil hørende hyppigheder. Ud fra eksperimentelt bestemte værdier af $P_{ow}$ har man ved at prøve sig frem kunnet opstille en liste over atom- og gruppefragmentværdier og en liste over korrektionsudtryk $F_j$ (såkaldte »faktorer«). Korrektionsudtrykkene er ordnet i flere forskellige klasser (a)(c). Det er forholdsvis kompliceret og tidkrævende at tage hensyn til alle regler og korrektionsudtryk. Der er udviklet edb-programmer hertil (b).

*Kombineret metode*

Beregningen af log $P_{ow}$ for komplekse molekyler kan forbedres betydeligt, hvis molekylet deles op i større delstrukturer, som man har pålidelige log $P_{ow}$-værdier for, enten fra tabeller (b)(c) eller fra egne målinger. Sådanne fragmenter (f.eks. heterocykliske forbindelser, anthraquinon, azobenzen) kan dernæst kombineres med Hanschs π-værdier eller Rekkers eller Leos fragmentkonstanter.

**Bemærkninger**

i) Beregningsmetoderne kan kun anvendes på helt eller delvis ioniserede forbindelser, hvis de nødvendige korrektionsfaktorer kan tages i betragtning.

▼B

ii) Hvis der må antages at forekomme intramolekylære hydrogenbindinger, må det hertil svarende korrektionsudtryk (ca. + 0,6 til + 1,0 log $P_{ow}$-enheder) lægges til (a). Rumlige modeller og spektroskopiske data kan afsløre, om der kan være tale om sådanne bindinger i molekylet

iii) Hvis flere tautomere former er mulige, benyttes den mest sandsynlige form som grundlag for beregningen.

iv) Man skal nøje følge med i revisioner af lister over fragmentkonstanter.

**Rapport**

Ved anvendelse af beregningsmetoder skal testrapporten om muligt indeholde følgende oplysninger:

— beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af alle muligheder for intramolekylære hydrogenbindinger, dissociation, ladning eller andre særlige forhold (f.eks. tautomeri)

— beskrivelse af beregningsmetoden

— identifikation af de anvendte datas oprindelse

— særlige valg af fragmenter

— udtømmende dokumentation af beregningen.

**HENVISNINGER**

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.

(b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol.1.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

*Tillæg 2*

**Anbefalede referencestoffer til HPLC-metoden**

| nr. | referencestof | $log_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 1 | 2-butanon | 0,3 | |
| 2 | 4-acetylpyridin | 0,5 | |
| 3 | anilin | 0,9 | |
| 4 | acetanilid | 1,0 | |
| 5 | benzylalkohol | 1,1 | |
| 6 | p-methoxyphenol | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | phenoxyeddikesyre | 1,4 | pKa = 3,12 |
| 8 | phenol | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 2,4-dinitrophenol | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | benzonitril | 1,6 | |
| 11 | phenylacetonitril | 1,6 | |
| 12 | 4-methylbenzylalkohol | 1,6 | |
| 13 | acetophenon | 1,7 | |
| 14 | 2-nitrophenol | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | 3-nitrobenzoesyre | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 4-chloranilin | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | nitrobenzen | 1,9 | |
| 18 | kanelalkohol | 1,9 | |
| 19 | benzoesyre | 1,9 | pKa = 4,19 |
| 20 | p-cresol | 1,9 | pKa = 10,17 |
| 21 | kanelsyre | 2,1 | pKa = 3,89 cis 4,44 trans |
| 22 | anisol | 2,1 | |
| 23 | methylbenzoat | 2,1 | |
| 24 | benzen | 2,1 | |
| 25 | 3-methylbenzoesyre | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 16 | 4-chlorphenol | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | trichlorethylen | 2,4 | |
| 28 | atrazin | 2,6 | |
| 29 | ethylbenzoat | 2,6 | |
| 30 | 2,6-dichlorbenzonitril | 2,6 | |
| 31 | 3-chlorbenzoesyre | 2,7 | pKa = 3,82 |
| 32 | toluen | 2,7 | |
| 33 | 1-naphthol | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 2,3-dichloranilin | 2,8 | |
| 35 | chlorbenzen | 2,8 | |
| 36 | allylphenylether | 2,9 | |
| 37 | brombenzen | 3,0 | |

▼B

| nr. | referencestof | $log_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 38 | ethylbenzen | 3,2 | |
| 39 | benzophenon | 3,2 | |
| 40 | 4-phenylphenol | 3,2 | pKa = 9,54 |
| 41 | thymol | 3,3 | |
| 42 | 1,4-dichlorbenzen | 3,4 | |
| 43 | diphenylamin | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | naphthalen | 3,6 | |
| 45 | phenylbenzoat | 3,6 | |
| 46 | isopropylbenzen | 3,7 | |
| 47 | 2,4,6-trichlorphenol | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | biphenyl | 4,0 | |
| 49 | benzylbenzoat | 4,0 | |
| 50 | 2,4-dinitro-6-sec-butylphenol | 4,1 | |
| 51 | 1,2,4-trichlorbenzen | 4,2 | |
| 52 | dodecansyre | 4,2 | |
| 53 | diphenylether | 4,2 | |
| 54 | n-butylbenzen | 4,5 | |
| 55 | phenanthren | 4,5 | |
| 56 | fluoranthen | 4,7 | |
| 57 | dibenzyl | 4,8 | |
| 58 | 2,6-diphenylpyridin | 4,9 | |
| 59 | triphenylamin | 5,7 | |
| 60 | DDT | 6,2 | |
| | Andre referencestoffer med lav log $P_{ow}$ | | |
| 1 | nikotinsyre | - 0,07 | |

▼B

A.9. **FLAMMEPUNKT**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets brændbarhed. Metoden kan anvendes for væsker, hvis dampe kan antændes af en antændelseskilde. De opregnede testmetoder er kun pålidelige i de flammepunktsintervaller, der er anført ved de enkelte metoder.

Ved valg af metode skal det tages med i overvejelserne, om der kan ske en kemisk reaktion mellem stoffet og testbeholderen.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Flammepunktet er den laveste temperatur, korrigeret til et tryk på 101,325 kPa, ved hvilken en væske under de i metoden fastsatte betingelser udvikler dampe i en sådan mængde, at de danner en brændbar blanding med luft i testbeholderen.

Enheder: °C

$t = T - 273{,}15$

(t er i °C og T er i K)

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en testbeholder og opvarmes eller afkøles til testtemperaturen efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i den enkelte testmetode. Der udføres antændelsesforsøg til konstatering af, om prøven antændes ved testtemperaturen eller ikke.

1.5. KVALITETSKRITERIER

1.5.1. **Repeterbarhed**

Repeterbarheden varierer alt efter flammepunktsområdet og den anvendte metode; højst 2 °C.

1.5.2. **Følsomhed**

Følsomheden afhænger af den anvendte testmetode.

1.5.3. **Specificitet**

Nogle af testmetoderne er begrænset til et bestemt flammepunktsinterval, og deres specificitet afhænger af andre stofegenskaber (f.eks. høj viskositet).

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Der anbringes en prøve af stoffet i testapparatet efter 1.6.3.1 og/eller 1.6.3.2.

Af sikkerhedshensyn anbefales det, at der kun anvendes en lille test, dvs. ca. 2 $cm^3$, af energirige og giftige stoffer.

1.6.2. **Testbetingelser**

For så vidt som det er foreneligt med sikkerhedskravene, skal apparatet anbringes et trækfrit sted.

1.6.3. **Udførelse af testen**

1.6.3.1. *Ligevægtsmetoden*

Se ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 og ISO 3679.

1.6.3.2. *Ikke-ligevægtsmetoden*

*Abel apparat:*

Se BS 2000 part 170, NF M07-011 og NF T66-009.

*Abel-Pensky apparat:*

Se EN 57, DIN 51755 part 1 (for temperaturer fra 5 °C til 65 °C), DIN 51755 part 2 (for temperaturer under 5 °C) og NF M07-036.

*Tag apparat:*

Se ASTM D 56.

*Pensky-Martens apparat:*

See ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 og NF M07-019.

*Bemærkninger:*

Hvis der ved en ikke-ligevægtsmetode i 1.6.3.2 findes et flammepunkt på 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C eller 55 ± 2 °C, skal det bekræftes ved en ligevægtsmetode med samme apparat.

Til anmeldelsesformål kan der kun bruges metoder, der giver flammepunktstemperaturen.

Til bestemmelse af flammepunktet af tyktflydende opløsningsmiddelholdige væsker (maling, lim og lignende) må der kun benyttes apparater og testmetoder, der er egnede til bestemmelse af tyktflydende væskers flammepunkt.

Se ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 og DIN 53213 part 1.

▼B

2. **DATA**

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— angivelse af den anvendte metode samt eventuelle afvigelser herfra

— resultaterne og supplerende bemærkninger af betydning for vurdering af dem.

4. **HENVISNINGER**

Ingen.

▼B

A.10. **ANTÆNDELIGHED (FASTE STOFFER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Testen udføres kun på stoffer, der foreligger som pulver, granulat eller pasta.

For ikke at medtage alle stoffer, der kan antændes, men kun dem, der brænder hurtigt eller på en måde, der er særlig farlig, anses kun de stoffer, hvis forbrændingshastighed overstiger en vis værdi, for at være let antændelige.

Det kan være særlig farligt, hvis forglødning kan fortsætte gennem metalpulver, da en brand er vanskelig at slukke. Metalpulver, hvori forglødningen kan udbrede sig i et bestemt tidsrum, anses for let antændelige.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Forbrændingstiden udtrykkes i sekunder.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet anbringes i en ca. 250 mm lang ubrudt stribe, og der foretages en indledende screeningstest til bestemmelse af, om der efter antænding med en gasflamme sker en forbrænding, der breder sig med åben flamme eller ved glødning. Hvis forbrændingen breder sig mere end 200 mm hen ad striben i løbet af et bestemt tidsrum, udføres der et komplet testprogram til bestemmelse af forbrændingshastigheden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen anført.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Indledende screeningprøve**

Stoffet anbringes på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en ca. 250 mm lang, 20 mm bred og 10 mm høj ubrudt stribe. En gasflamme (mindste diameter 5 mm) holdes hen til den ene ende af striben, indtil pulveret bryder i brand, dog højst 2 minutter (5 minutter for pulver af metal og metallegeringer). Det noteres, om forbrændingen breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperioden på 4 minutter (40 minutter for metalpulver). Hvis stoffet ikke bryder i brand eller forbrændingen ikke med åben flamme eller ved glødning breder sig 200 mm hen ad striben i løbet af testperiodens 4 minutter (40 minutter), anses stoffet ikke for at være let antændeligt, og yderligere testning er ikke påkrævet. Hvis forbrændingen i stoffet breder sig 200 mm hen ad striben på mindre end 4 minutter eller mindre end 40 for metalpulver, gennemføres nedenstående test (1.6.2).

1.6.2. **Test af forbrændingshastigheden**

1.6.2.1. *Forberedelse*

Stoffer, der foreligger som pulver eller granulat, fyldes løst i en 250 mm lang form, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Derefter lader man tre gange formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde. Om nødvendigt fyldes formen op igen. Sidestykkerne fjernes, og overskydende materiale skrabes af. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Pasta-agtige stoffer bredes ud på en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade i en 250 mm lang pølse med et tværsnit på ca. 1 $cm^2$.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Er stoffet følsomt over for fugt, gennemføres testen så hurtigt som muligt efter, at stoffet er taget ud af beholderen.

1.6.2.3. *Udførelse af prøvningen*

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under prøvningen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Volden antændes i den ene ende med en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Når forbrændingen har forplantet sig 80 mm, måles udbredelseshastigheden over de næste 100 mm.

▼B

Testen udføres seks gange, hver gang med en ren kold plade, medmindre der observeres et positivt resultat tidligere.

2. **DATA**

Forbrændingstiden fra den indledende screeningstest (1.6.1) og den korteste forbrændingstid i op til seks test (1.6.2.3) er relevante for vurderingen.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— en nøjagtig beskrivelse af det testede stof, dets fysiske tilstandsform og dets fugtindhold

— resultaterne af den indledende screeningstest og af testen af forbrændingshastigheden, hvis den er udført

— alle yderligere bemærkninger af betydning for vurdering af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Stoffer, der foreligger i form af pulver, granulat eller pasta, anses for at være let antændelige, hvis forbrændingstiden i nogen af de test, der er udført efter 1.6.2, er mindre end 45 sekunder. Pulver af metal eller en metallegering anses for at være let antændeligt, hvis det kan antændes og flammen eller reaktionszonen forplanter sig over hele testen på 10 minutter eller derunder.

4. **HENVISNINGER**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

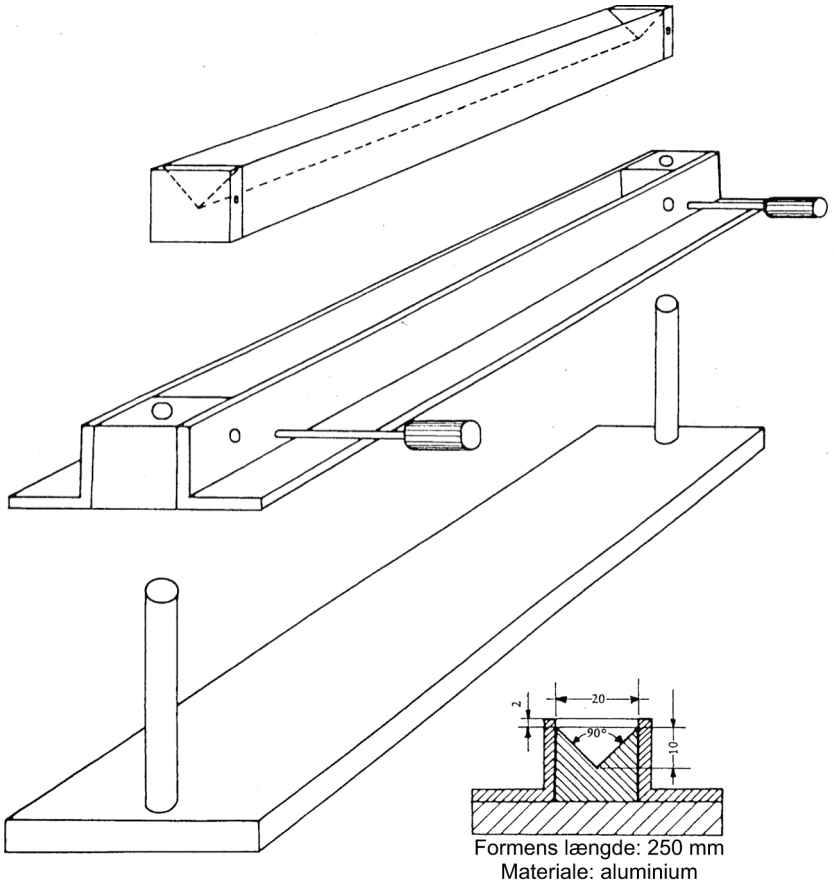
▼B

*Tillæg*

*Figur*

**Form og tilbehor til fremstilling af volden**

(alle mal i millimeter)




Formens længde: 250 mm
Materiale: aluminium

▼B

A.11. **ANTÆNDELIGHED (GASSER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Med denne metode kan det bestemmes, om en gas blandet med luft ved stuetemperatur (ca. 20 °C) og atmosfæretryk kan antændes, og i så fald i hvilket koncentrationsområde. Blandinger med stigende koncentrationer af prøvegassen med luft påvirkes med en elektrisk gnist, og det iagttages, om der sker antændelse.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Området for antændelighed er koncentrationsområdet mellem den nedre og den øvre eksplosionsgrænse. Nedre og øvre eksplosionsgrænse er de koncentrationsgrænser for den antændelige gas i blanding med luft, ved hvilke der ikke sker nogen flammeudbredelse.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.4. METODENS PRINCIP

Koncentrationen af gassen i luft øges trinvis, og blandingen påvirkes ved hvert trin med en elektrisk gnist.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

Testbeholderen er en opretstående glascylinder med en indre diameter på mindst 50 mm og en højde på mindst 300 mm. Antændelseselektroderne er placeret 60 mm over cylinderens bund med en indbyrdes afstand på 3 til 5 mm. Cylinderen er forsynet med en trykaflastningsåbning. Apparatet skal afskærmes, så eventuelle eksplosionsskader begrænses.

Som antændelseskilde anvendes en stående induktionsgnist med en varighed på 0,5 sek. Den dannes af en højspændingstransformator med en sekundærspænding på 10 til 15 kV (største tilførte effekt 300 W). I henvisning (2) er der vist et eksempel på et egnet apparat.

1.6.2. **Testbetingelser**

Testen skal udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

▼B

1.6.3. **Udførelse af testen**

Ved hjælp af doseringspumper ledes en gas/luftblanding med kendt koncentration ind i glascylinderen. Blandingen påvirkes med en gnistudladning, og det iagttages, om der ved antændelseskilden opstår en flamme, som forplanter sig af sig selv. Gaskoncentrationen varieres i intervaller på 1 vol. %, indtil der sker antændelse som beskrevet ovenfor.

Hvis det ud fra kendskab til gassens kemiske struktur må formodes, at gassen ikke kan antændes, og sammensætningen af den støkiometriske blanding med luft kan beregnes, behøver man kun at afprøve blandinger fra 10 % under til 10 % over det støkiometriske blandingsforhold.

2. **DATA**

Den eneste information, der er relevant for bestemmelse af denne egenskab, er, om der forekommer flammeudbredelse.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— beskrivelse af det anvendte apparat med angivelse af dimensioner

— den temperatur, som testen er udført ved

— de afprøvede koncentrationer og de opnåede resultater

— testens resultat: ikke-antændelig eller let antændelig gas

— konkluderes det, at gassen er ikke-antændelig, anføres det koncentrationsområde, hvor prøvning med 1 % intervaller har fundet sted

— alle oplysninger og bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. »Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen«. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126-127.

▼B

A.12. **ANTÆNDELIGHED (KONTAKT MED VAND)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Denne testmetode kan anvendes til bestemmelse af, om et stof ved reaktion med vand udvikler farlige mængder gas, der eventuelt er let antændelig.

Testmetoden kan anvendes til både væsker og faste stoffer. Den kan ikke anvendes til stoffer, der spontant bryder i brand, når de kommer i kontakt med luften.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Let antændelig: stoffer, som ved kontakt med vand eller fugtig luft udvikler let antændelige gasser i farlige mængder, dvs. mindst 1 liter/kg pr. time.

1.3. METODENS PRINCIP

Testen foregår trinvis som beskrevet nedenfor; testen kan afbrydes, når der sker antænding. Hvis det vides, at stoffet ikke reagerer voldsomt med vand, kan man begynde med trin 4 (1.3.4).

1.3.1. **Trin 1**

Teststoffet anbringes i et kar med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.2. **Trin 2**

Teststoffet anbringes på et stykke filtrerpapir, der flyder på overfladen i en skål med destilleret vand ved 20 °C, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand. Filtrerpapiret tjener udelukkende til at holde stoffet samlet på ét sted for at øge chancerne for antændelse.

1.3.3. **Trin 3**

Teststoffet arrangeres i en ca. 2 cm høj bunke med en diameter på ca. 3 cm. Der tilsættes et par dråber vand til bunken, og det konstateres, om den udviklede gas bryder i brand.

1.3.4. **Trin 4**

Teststoffet blandes med destilleret vand ved 20 °C, og gasudviklingens hastighed måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis hastigheden efter 7 timer er uregelmæssig eller stigende, forlænges måleperioden, dog højst til 5 dage. Testen kan afbrydes, hvis hastigheden på noget tidspunkt overstiger 1 liter/kg pr. time.

▼B

1.4. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Trin 1**

1.6.1.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.1.2. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm i diameter) anbringes i et kar med destilleret vand. Det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.2. **Trin 2**

1.6.2.1. *Apparatur*

Et stykke filtrerpapir anbringes fladt flydende på overfladen af destilleret vand i en egnet beholder, f.eks. en afdampningsskål med en diameter på 100 mm.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

En lille mængde af teststoffet (ca. 2 mm diameter) anbringes midt på filtrerpapiret. Det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

1.6.3. **Trin 3**

1.6.3.1. *Testbetingelser*

Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

1.6.3.2. *Udførelse af testen*

Teststoffet anbringes i en ca. 2 cm høj bunke på ca. 3 cm i diameter med en fordybning i toppen. Der anbringes et par dråber vand i fordybningen, og det noteres, i) om der udvikles gas, og ii) om gassen bryder i brand. Hvis gassen bryder i brand, behøves der ikke yderligere testning, idet stoffet anses for farligt.

▼B

1.6.4. **Trin 4**

1.6.4.1. *Apparatur*

Der anvendes et apparat som vist på figuren.

1.6.4.2. *Testbetingelser*

Det undersøges visuelt, om beholderen med teststof indeholder pulver på under 500 μm (partikelstørrelse). Hvis pulver udgør mere end 1 % (w/w) af den samlede prøve eller prøven er smuldrende, formales hele testen til pulver inden testen, så der tages hensyn til reduktion af partikelstørrelsen under opbevaring og håndtering; i alle andre tilfælde undersøges testen i den stand, hvori den er modtaget. Testen udføres ved stuetemperatur (ca. 20 °C) og atmosfæretryk.

1.6.4.3. *Udførelse af testen*

Der anbringes 10-20 ml vand i apparatets tildrypningstragt og 10 g stof i den koniske kolbe. Den udviklede gasmængde kan måles ved enhver egnet metode. Tildrypningstragtens hane åbnes, så vandet løber ned i kolben, og et stopur startes. Gasudviklingen måles hver time over en periode på 7 timer. Hvis gasudviklingen er uregelmæssig i denne periode eller stiger hen mod periodens slutning, fortsættes målingerne i op til 5 døgn. Hvis gasudviklingen på noget tidspunkt kommer over 1 liter/kg pr. time, kan testen afbrydes. Testen gentages yderligere to gange.

Hvis gassens kemiske sammensætning ikke er kendt, foretages der en analyse af den. Hvis gassen indeholder let antændelige bestanddele, og det ikke vides, om hele blandingen er let antændelig, fremstilles der en blanding med samme sammensætning, som test efter metode A.11.

2. **DATA**

Stoffet anses for farligt, hvis

— det spontant bryder i brand på noget trin af testen

eller

— der udvikles brændbar gas i større mængde end 1 liter/kg pr. time.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— eventuel forbehandling af teststoffet

▼B

— resultatet af testen (trin 1, 2, 3 og 4)

— den udviklede gas' kemiske sammensætning

— gasudviklingshastigheden, hvis trin 4 (1.6.4) udføres

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

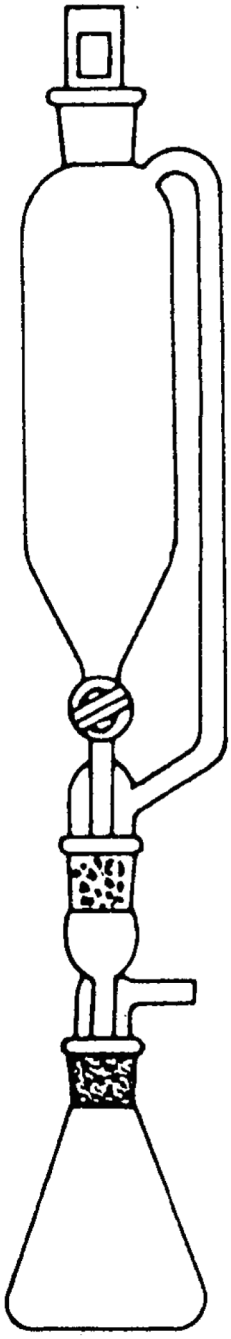
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

*Tillæg*

*Figur*

**Apparatur**



▼B

## A.13 VÆSKERS OG FASTE STOFFERS PYROFORISKE EGENSKABER

### 1. METODE

#### 1.1. INDLEDNING

Testmetoden kan anvendes for væsker og faste stoffer, der i små mængder spontant bryder i brand kort tid efter at være kommet i kontakt med luften ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Stoffer, der skal udsættes for luftens påvirkning i flere dage eller timer ved stuetemperatur, førend der sker antændelse, omfattes ikke af denne testmetode.

#### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Stoffer anses for at være selvantændelige, hvis de bryder i brand eller forkuller under betingelserne i 1.6.

Det kan også være påkrævet at undersøge væskers selvantændelse med metode A.15 Selvantændelsestemperatur (væsker og gasser).

#### 1.3. REFERENCESTOFFER

Ikke specificeret.

#### 1.4. METODENS PRINCIP

Stoffet, fast eller flydende, blandes med en inaktiv bærer og bringes i kontakt med luften ved stuetemperatur i 5 minutter. Væsker, der ikke bryder i brand, absorberes dernæst på filtrerpapir og udsættes for luftens påvirkning ved omgivende temperatur (ca. 20 °C) i 5 minutter. Flydende og faste stoffer, der bryder i brand, og væsker, der bryder i brand eller får filtrerpapiret til at forkulle, anses for at være selvantændelige.

#### 1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarhed: på grund af den sikkerhedsmæssige betydning er et enkelt positivt resultat tilstrækkeligt til, at stoffet anses for selvantændeligt.

#### 1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

##### 1.6.1. **Apparatur**

Der fyldes et ca. 5 mm tykt lag diatoméjord i en porcelænsskål med en diameter på ca. 10 cm ved stuetemperatur (ca. 20 °C).

Bemærk:

Diatoméjord eller et andet tilsvarende inaktivt stof, som er let at få fat i, antages at repræsentere den jord, som teststoffet kunne blive spildt på i tilfælde af uheld.

Der behøves tørt filtrerpapir til test af væsker, som ikke bryder i brand ved kontakt med luften, når de er blandet med et inaktivt bæremateriale.

▼B

1.6.2. **Udførelse af testen**

a) *Faste stoffer i pulverform*

Fra en højde af ca. 1 m hældes 1-2 $cm^3$ af pulveret ned på en ikke-brændbar flade, og det iagttages, om stoffet bryder i brand under faldet eller inden for 5 minutter derefter.

Testen udføres seks gange, medmindre der sker antændelse.

b) *Væsker*

Ca. 5 $cm^3$ af testvæsken hældes ud i den klargjorte porcelænsskål, og det iagttages, om stoffet bryder i brand, inden der er gået 5 minutter.

Hvis der ikke sker antændelse i nogen af de seks forsøg, udføres følgende forsøg:

Med en injektionssprøjte sprøjtes 0,5 ml af prøven ud på et bøjet stykke filtrerpapir, og det iagttages, om der inden for 5 minutter sker antændelse eller forkulning af filtrerpapiret. Forsøget udføres 3 gange, medmindre der sker antændelse eller forkulning.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Testen kan afbrydes, så snart et af forsøgene giver positivt resultat.

2.2. EVALUERING

Hvis stoffet bryder i brand inden 5 minutter efter, at det er tilsat til en inaktiv bærer og blevet udsat for luftens påvirkning, eller hvis en væske får et stykke filtrerpapir til at forkulle eller bryde i brand, inden 5 minutter efter at stoffet er tilsat og blevet udsat for luftens påvirkning, anses stoffet (væsken) for at være selvantændeligt.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— resultaterne af testen

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. **EKSPLOSIVE EGENSKABER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Metoden indeholder et testsystem til bestemmelse af, om et fast eller pastaagtigt stof frembyder eksplosionsfare, når det udsættes for påvirkning med en flamme (varmefølsomhed) eller ved slag eller friktion (følsomhed over for mekanisk påvirkning), og om en væske frembyder eksplosionsfare, når den udsættes for påvirkning med en flamme eller ved slag.

Metoden består af tre dele:

a) en test for varmefølsomhed (1)

b) en test for følsomhed over for slagpåvirkning (1)

c) en test for følsomhed over for friktionspåvirkning (1).

Metoden giver data til vurdering af sandsynligheden for, at der ved visse almindelige påvirkninger fremkaldes en eksplosion. Metoden tilsigter ikke at fastslå, om stoffet overhovedet kan bringes til at eksplodere.

Metoden er egnet til bestemmelse af, om et stof frembyder en eksplosionfare (varmefølsomhed og mekanisk følsomhed) under de særlige betingelser, der er specificeret i direktivet. Metoden er baseret på en række apparattyper, som i vidt omfang anvendes internationalt (1), og som sædvanligvis giver brugbare resultater. Det erkendes, at metoden ikke er definitiv. Der kan benyttes andet apparatur end det specificerede, forudsat at det er internationalt anerkendt, og at de fundne resultater kan korreleres til resultater opnået med det specificerede apparatur.

Testen behøver ikke at udføres, hvis det på grundlag af foreliggende termodynamiske oplysninger (f.eks. dannelsesvarme eller dekomponeringsvarme) og/eller en strukturformel, hvori visse reaktive grupper (2) ikke indgår, må anses for hævet over enhver rimelig tvivl, at stoffet er ude af stand til hurtig dekomponering ledsaget af gasudvikling eller varmefrigørelse (dvs. at stoffet ikke frembyder nogen eksplosionsfare). For væsker kræves der ikke test for friktionsfølsomhed.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Eksplosiv:

Stoffer, som kan eksplodere ved flammepåvirkning, eller som er følsomme over for slag eller friktion (eller mere følsomme over for mekanisk påvirkning end 1,3-dinitrobenzen i et alternativt apparat).

1.3. REFERENCESTOFFER

1,3-dinitrobenzen, teknisk krystallinsk produkt, sigtet på 0,5 mm sigte, til friktions- og slagpåvirkningsmetoden.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogen, cyclonite — CAS 121-82-4), omkrystalliseret i vandig cyclohexanon, vådsigtet på 250 μm sigte og tilbageholdt på en 150 μm sigte, tørret ved 103 ± 2 °C (i 4 timer) til anden række friktions- og slagprøvninger.

▼B

1.4. METODENS PRINCIP

Der kræves indledende testning til bestemmelse af, hvordan de tre følsomhedstest kan udføres under betryggende forhold.

1.4.1. **Test for sikker håndtering (3)**

Af sikkerhedshensyn foretages der før den egentlige test en indledende test bestående i, at en meget lille testmængde (ca. 10 mg) opvarmes fritliggende i en gasflamme, og påvirkes med slag i et passende apparat og ved friktion ved hjælp af en hammer mod en ambolt eller et andet friktionsapparat. Formålet er at fastslå, om stoffet er så følsomt og eksplosivt, at den foreskrevne følsomhedstest, især for varmefølsomhed, må udføres under iagttagelse af særlige forholdsregler, så operatøren ikke kan komme til skade.

1.4.2. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

Metoden består i opvarmning af stoffet i et stålrør, der er lukket med en mundingsplade. Ved hjælp af mundingsplader med forskellige huldiametre kan det bestemmes, om stoffet er tilbøjeligt til at eksplodere under stærk varmepåvirkning og veldefineret indeslutningsgrad.

1.4.3. **Mekanisk følsomhed (slag)**

Metoden består i, at stoffet udsættes for et slag med et specificeret lod, der falder fra en specificeret højde.

1.4.4. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

Metoden består i, at et fast eller pastaagtigt stof udsættes for friktion mellem standardoverflader med specificeret belastning og ved specificeret relativ bevægelse.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ikke anført.

1.6. BESKRIVELSE AF METODERNE

1.6.1. **Varmefølsomhed (virkningen af en flamme)**

1.6.1.1. *Apparatur*

Apparaturet består af et engangsstålrør med lukkeanordning (figur 1) anbragt i en opvarmnings- og beskyttelsesanordning. Røret er af dybtrukket stålplade (se tillægget) og har en indvendig diameter på 24 mm, en længde på 75 mm og en godstykkelse på 0,5 mm. Røret har i den åbne ende en flange, så det kan lukkes med mundingspladen ved hjælp af en todelt forskruning (møtrik og krave med gevind). Mundingspladen er trykmodstandsdygtig og har et hul i midten. Møtrikken og kraven med gevind er fremstillet i chrommanganstål (se tillægget), som er gnistfrit op til 800 °C. Der foreligger mundingsplader med en række forskellige huldiametre, som er fremstillet i 6 mm tykt varmebestandigt stål (se tillægget).

▼B

1.6.1.2. *Testbetingelser*

Normalt testes stoffet i den tilstand, hvori det er modtaget, men i visse tilfælde, f.eks. hvis det foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, kan det være nødvendigt at knuse stoffet før testen.

For faste stoffer bestemmes den mængde materiale, der skal anvendes til testen, ved en to-trins procedure. Først fyldes der i et tareret rør 9 $cm^3$ af stoffer, som nedstampes med en kraft på 80 N fordelt over hele rørtværsnittet. Af sikkerhedshensyn eller i tilfælde, hvor stoffet kan ændre fysisk form ved kompression, kan der benyttes andre påfyldningsmetoder; eksempelvis er stampning ikke egnet, hvis stoffet er meget friktionsfølsomt. Hvis materialet kan komprimeres, tilsættes der mere og stampes, indtil røret er fyldt til en højde af 55 mm fra overkanten. Den samlede mængde, der er brugt til fyldning af røret til denne højde, bestemmes, og der tilsættes endnu 2 portioner, som stampes med en kraft på 80 N. Der tilsættes materiale med stampning eller fjernes materiale, så røret er fyldt til 15 mm fra overkanten. Det andet trin foregår ved, at der først tilsættes og stampes en tredjedel af den samlede mængde, der blev brugt til det første trin. Der tilsættes endnu 2 portioner med stampning med 80 N, og materialets højde i røret justeres til 15 mm fra overkanten ved tilsætning eller fjernelse af materiale. Til hvert forsøg anvendes den mængde fast stof, der er fundet ved dette andet trin; påfyldningen sker i 3 lige store portioner, der hver komprimeres til 9 $cm^3$ med den fornødne kraft. (Dette gøres lettest ved anvendelse af afstandsringe).

Væsker og geler fyldes i røret til en højde af 60 mm, idet det for gelernes vedkommende nøje påses, at der ikke dannes luftbobler. Kraven med gevind føres op om røret nedefra, den valgte mundingsplade indsættes, og møtrikken strammes efter smøring med et molybdænsulfidbaseret smøremiddel. Det er yderst vigtigt at kontrollere, at der hverken har sat sig stof mellem flangen og pladen eller i gevindet.

Opvarmningen sker med propan, der fra en industriel trykflaske med trykregulator (60-70 mbar) ledes gennem en måler og fordeles ligeligt til 4 brændere gennem en manifold (hvilket kontrolleres ved visuel inspektion af brændernes flammer). Brænderne er placeret omkring prøvekammeret som vist på figur 1. De 4 brænderes samlede forbrug er på ca. 3,2 liter propan pr. minut. Der kan anvendes andre brændstoffer og brændere, men opvarmningshastigheden skal være som specificeret i figur 3. Uanset det anvendte apparatur skal opvarmningshastigheden regelmæssigt kontrolleres med dibutylphthalatfyldte rør, som vist på figur 3.

1.6.1.3. *Udførelse af testene*

Hver test varer, indtil røret enten sønderdeles eller røret har været opvarmet i 5 minutter. En test, hvorved røret sønderdeles i tre eller flere fragmenter, som eventuelt hænger sammen med smalle metalstrimler som vist på figur 2, vurderes som en eksplosion. En test, der fører til færre fragmenter eller ingen fragmentering, betragtes ikke som en eksplosion.

▼B

Der udføres først tre test med en mundingsplade med et 6,0 mm hul, og opnås der ingen eksplosion, udføres endnu tre test med en mundingsplade med et 2,0 mm hul. Finder der eksplosion sted under én af disse forsøgsrækker, er yderligere testning ikke påkrævet.

1.6.1.4. *Evaluering*

Testens resultat anses for positivt, hvis der sker eksplosion i én af ovennævnte forsøgsrækker.

1.6.2. **Mekanisk følsomhed (slag)**

1.6.2.1. *Apparatur (figur 4)*

Hoveddelene af et typisk faldhammerapparat er en støbt stålblok med bundplade, ambolt, stander, styr, faldlodder, frigørelsesmekanisme og prøveholder. Stålambolten på 100 mm (diameter) × 70 mm (højde) er skruet fast oven på en stålblok på 230 mm (længde) × 250 mm (bredde) × 200 mm (højde) med støbt bundplade på 450 mm (længde) × 450 mm (bredde) × 60 mm (højde). En stander bestående af et sømløst trukket stålrør er fastgjort i en holder, der er fastskruet bag på stålblokken. Apparatet er forankret til en massiv betonklods på 60 × 60 × 60 cm med fire skruer, så styrene er fuldstændig lodrette og faldlodderne kan falde frit. Der findes lodder på 5 og 10 kg fremstillet i massivt stål. Loddernes slaghoved er af hærdet stål, HRC 60 til 63, og har en diameter på mindst 25 mm.

Testen er indeholdt i en slaganordning bestående af to massive stålcylindre anbragt koaksialt over hinanden i en hul cylindrisk styrering af stål. Stålcylindrene skal have en diameter på 10 (- 0,003, - 0,005) mm og en højde på 10 mm og have polerede endeflader, afrundede kanter (krumningsradius 0,5 mm) og en hårdhed på HRC 58 til 65. Den hule cylinder skal have en udvendig diameter på 16 mm, en poleret udboring på 10 (+ 0,005, + 0,010) mm og en højde på 13 mm. Slaganordningen samles på en mellemambolt (diameter 26 mm, højde 26 mm) af stål og centreres med en ring, hvori der er huller til bortledning af eksplosionsprodukterne.

1.6.2.2. *Testbetingelser*

Testvolumenet skal være på 40 $mm^3$ eller det volumen, der passer til et alternativt apparat. Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen fra 0,5 mm til 1 mm diameter bruges til testen og skal være repræsentativ for det oprindelige stof.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand og under alle omstændigheder efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel. Ved test af væsker er der en afstand på 1 mm mellem den øverste og den nederste stålcylinder.

▼B

1.6.2.3. *Udførelse af testen*

Der udføres seks forsøg, hvor 10 kg's loddet falder fra en højde af 0,40 m (40 J). Forekommer der eksplosion i et af de 6 forsøg med 40 J, udføres der en ny række på seks forsøg, hvor et 5 kg's lod falder fra en højde af 0,15 m (7,5 J). I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.2.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (opflamning og knald betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede slagapparat, eller hvis prøven er mere følsom end 1,3-dinitrobenzen eller RDX i en alternativ slagtest.

1.6.3. **Mekanisk følsomhed (friktion)**

1.6.3.1. *Apparatur (figur 5)*

Friktionsapparatet består af en støbt bundplade af stål, hvorpå friktionsanordningen er monteret. Den består af en fastsiddende porcelænsstift og en bevægelig porcelænsplade. Porcelænspladen fastholdes i en slæde, der glider på to styr. Slæden er via en forbindelsesstang, en krumtap og et passende gear forbundet med en elmotor, således at porcelænspladen bevæges 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften én gang. Porcelænsstiften kan belastes f.eks. med 120 eller 360 newton.

Porcelænspladerne er flade og er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn (ruhed 9 til 32 μm) og har dimensionerne 25 mm (længde) × 25 mm (bredde) × 5 mm (højde). Den cylindriske porcelænsstift, der ligeledes er fremstillet af hvidt teknisk porcelæn, har en længde på 15 mm, en diameter på 10 mm og ru kugleformede endeflader med en krumningsradius på 10 mm.

1.6.3.2. *Testbetingelser*

Prøvevolumenet skal være på 10 $mm^3$ eller det volumen, der passer til et alternativt apparat.

Faste stoffer testes i tør tilstand og forberedes således:

a) stoffer i pulverform sigtes (0,5 mm sigte); alt hvad der passerer gennem sigten bruges til testen

b) stoffer, der foreligger i presset, støbt eller anden kompakt form, findeles og sigtes; sigtefraktionen < 0,5 mm diameter bruges til testen.

Stoffer, som normalt forekommer i pastaform skal om muligt testes i tør tilstand. Hvis stoffet ikke kan tørres, skal pastaen (efter fjernelse af størst mulig mængde opløsningsmiddel) testes som et 0,5 mm tykt lag med en bredde på 2 mm og en længde på 10 mm, der udlægges med en skabelon.

▼B

1.6.3.3. *Udførelse af testen*

Porcelænsstiften anbringes på prøven, og belastningen påsættes. Ved udførelse af testen skal skuremærkerne på porcelænspladen vende på tværs af bevægelsesretningen. Det må nøje påses, at der er tilstrækkeligt testmateriale under stiften, og at pladen bevæger sig korrekt under stiften. Til anbringelse af pastaagtige stoffer på pladen anvendes der en 0,5 mm tyk skabelon med et åbent felt på 2 × 10 mm. Porcelænspladen skal bevæge sig 10 mm frem og tilbage under porcelænsstiften i løbet af 0,44 sekunder. Hver del af porcelænspladen og -stiften må kun bruges én gang; de to ender af en stift kan bruges til to forsøg og de to flader af en plade kan hver bruges til tre forsøg.

Der udføres seks forsøg med en belastning på 360 N. Forekommer der eksplosion i et af disse seks forsøg, udføres der en ny række på seks forsøg med en belastning på 120 N. I andre apparater sammenlignes prøven med det valgte referencestof ved hjælp af en fastlagt procedure (f.eks. up-and-down teknik).

1.6.3.4. *Evaluering*

Testresultatet anses for positivt, hvis der sker eksplosion (knitren og/eller knald eller opflamning betragtes som eksplosion) i mindst ét af forsøgene med det specificerede friktionsapparat, eller hvis de tilsvarende kriterier i en alternativ friktionstest er opfyldt.

2. **DATA**

Principielt anses et stof for at være eksplosionsfarligt i direktivets forstand, hvis der ved testen for varme-, slag- eller friktionsfølsomhed opnås et positivt resultat.

3. **RAPPORTERING**

3.1. PRØVNINGSRAPPORTEN

Prøvningsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— teststoffets betegnelse, sammensætning, renhed, fugtindhold mv.

— prøvens fysiske tilstandsform samt oplysning om, om den er knust, findelt og/eller sigtet

— iagttagelser under testen for varmefølsomhed (f.eks. testmasse, antal fragmenter mv.)

— iagttagelser under testen for mekanisk følsomhed (f.eks. dannelse af væsentlige røgmængder eller fuldstændig dekomponering uden knald, flammer, gnister, knitren mv.)

— resultaterne af hver forsøgstype

— videnskabelig begrundelse for eventuel anvendelse af et alternativt apparat, samt godtgørelse af korrelationen mellem resultaterne med det specificerede apparat og resultaterne med et tilsvarende apparat

▼B

— nyttige bemærkninger, såsom henvisning til forsøg med lignende produkter, som kan være relevante for korrekt fortolkning af resultaterne

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkning af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING OG EVALUERING AF RESULTATERNE

I testrapporten skal alle resultater, der anses for ukorrekte, unormale eller ikke-repræsentative, nævnes. Hvis der skal ses bort fra nogle af resultaterne, skal dette forklares og resultaterne af supplerende eller alternativ test oplyses. Kan der ikke redegøres for et unormalt resultat, skal det tages for pålydende, og stoffet skal klassificeres i overensstemmelse hermed.

4. **HENVISNINGER**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 and 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

*Tillæg*

**Eksempel på materialespecifikation for varmefølsomhedstesting (se DIN 1623)**

(1) Rør: Materialespecifikation nr. 1.0336.505 g

(2) Mundingsplade: Materialespecifikation nr. 1.4873

(3) Krave med gevind og møtrik: Materialespecifikation nr. 1.3817

*Figur 1*

**Apparat til testing for varmefølsomhed**

(alle dimensioner i mm)

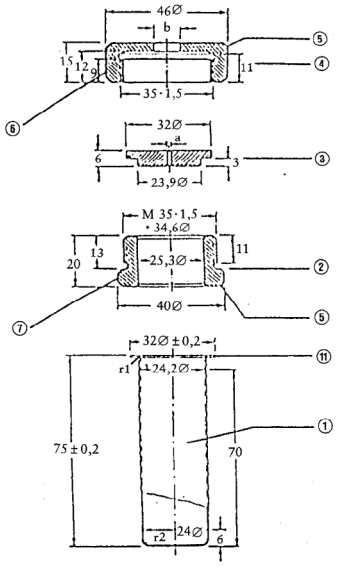



Fig. 1a Stålrør og tilbehør

(1) rør
(1a) udvendig flange
(2) krave med lavfriktionsgevind
(3) mundingsplade a = 2,0 eller 6,0 mm diameter
(4) møtrik b - 10 mm diameter
(5) rejfet kant
(6) 2 spændflader til 41 mm nøgle

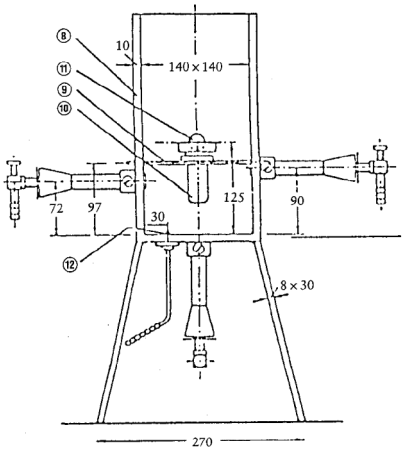



Fig. 1b Opvarmnings- og beskyttelsesanordning

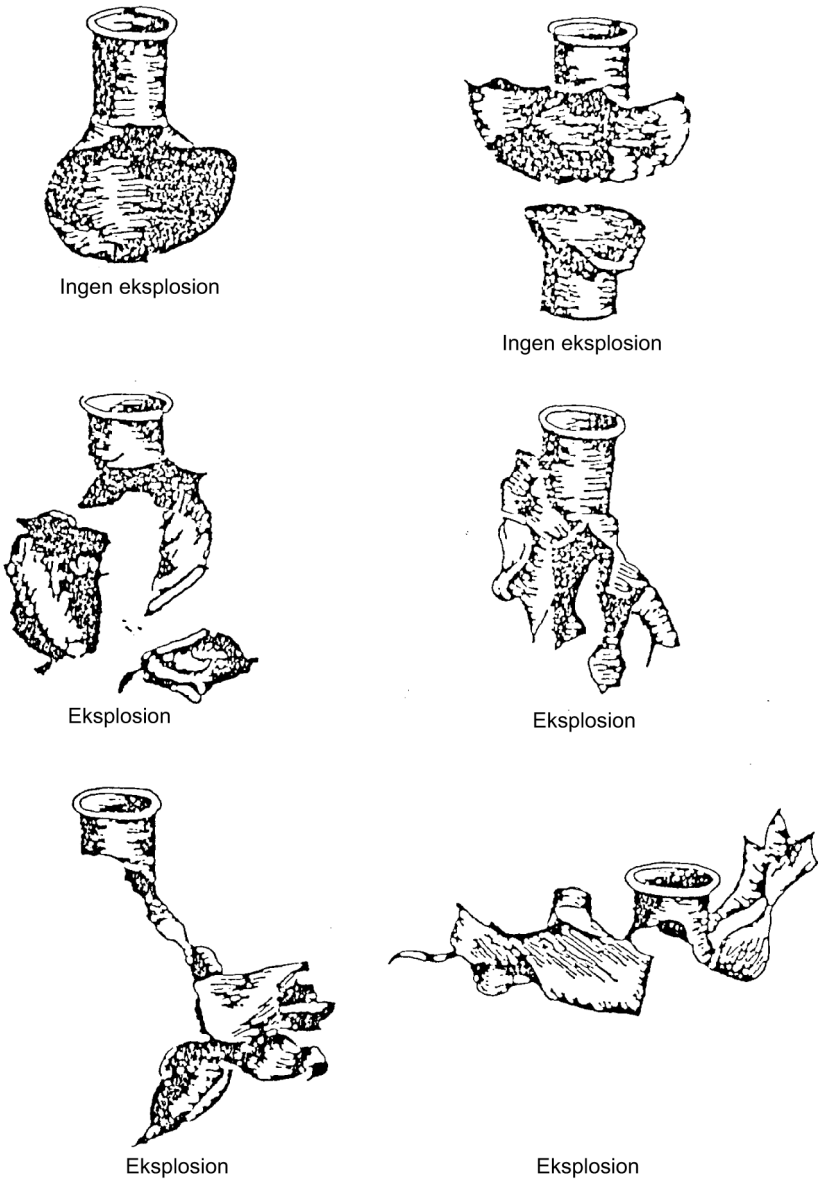
(7) 2 spændflader til 36 mm nøgle
(8) sprængstyksikkert kammer
(9) 2 bærestænger til røret
(10) samlet rør
(11) bageste brænders position; de andre brændere er synlige
(12) vågeflamme

▼B

*Figur 2*

**Test for varmefølsomed**

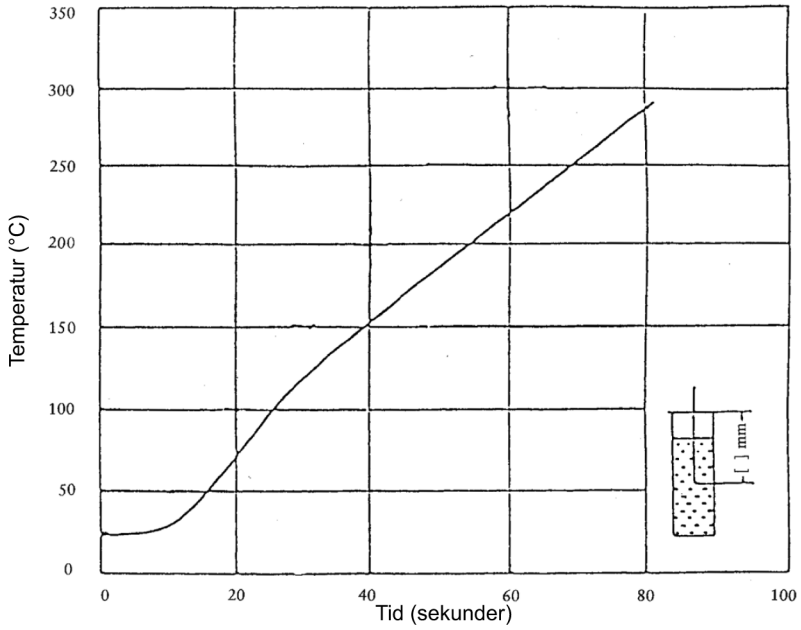
Eksempler på fragmentering



▼B

*Figur 3*

**Kalibrering af opvarmingshastigeden ved test af varmefølsomed**



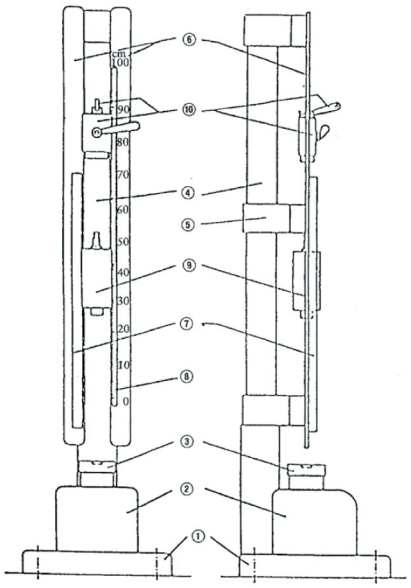

Kurve over temeraturforløbet mod tiden ved opvarmning af dibutylphthalat (27 $cm_3$ i et lukket rør (mundingslade med 1,5 mm hul) med et propanflow på 3,2 litter/minut. Temperaturen er målt med chromel/alumel-termoelement med 1 mm indkapsling i rustfrit stål, anbragt central 43 mm under rørets overkant. Mellen 135 ºC og 285 ºC skal opvarmningshastigheden være 185-215 K/minut.

▼B

*Figur 4*

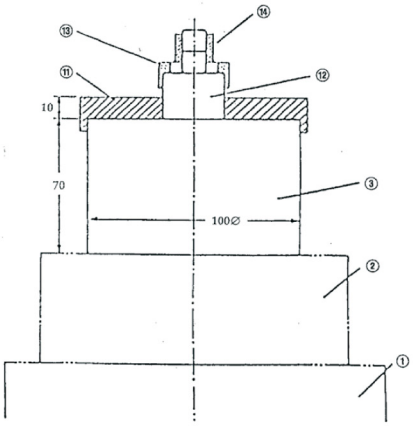
**Apparat til slagprøvning**

**(alle dimensioner i mm)**




Figur 4a. Faldhammer, forfra og fra siden, oversigtstegning

(1) bundplade, 450 x 450 x 60
(2) stålblok, 230 x 250 x 200
(3) ambolt, 100 (diameter) x 70
(4) stander
(5) mellemtravers
(6) 2 styr
(7) tandstang



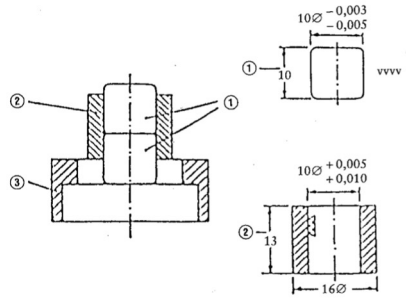

Figur 4b. Faldhammer, nederste del

(8) skala
(9) faldhammer (faldlod)
(10) fastholdelses- og frigørelsesanordning
(11) holdeplade
(12) mellemambolt (udskiftelig) 26 (diameter) x 26
(13) holdering med åbninger
(14) slaganordning

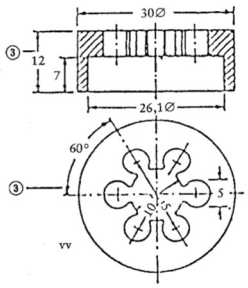
▼B

*Figur 4*

**Fortstat**

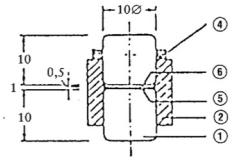


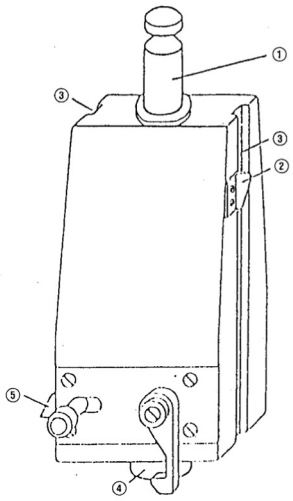

Figur. 4c. Slaganordning for stoffer, der foreligger i form af pulver eller pasta




Figur. 4d. Slaganordning for væsker

(1) stålcylindre
(2) styrering for stålcylindrene
(3) holdering med åbninger
(a) lodret snit
(b) plan
(4) gummiring
(5) væske (40 $mm^3$)
(6) væskefrit rum



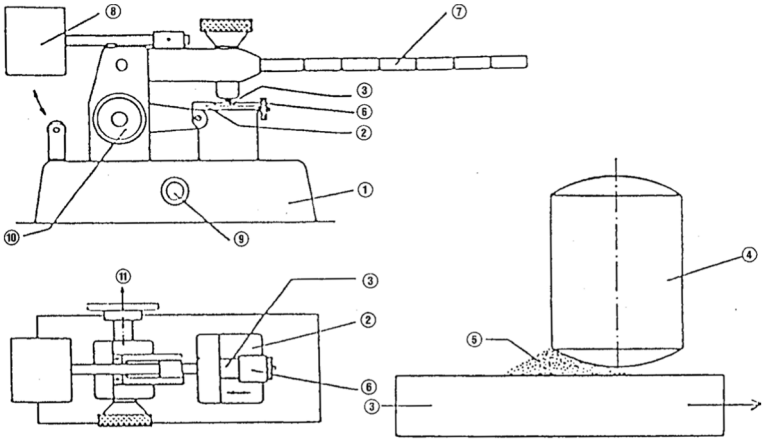
Figur. 4e. Hammer (faldlod på 5 kg)

(1) ophængningstap
(2) højdemærke
(3) styrefals
(4) cylindrisk slaghoved
(5) bagslagshage

▼B

*Figur 5*

**Apparat til friktionsfølsomhed**




Figur 5a. Friktionsapparat – vertikalprojektion og grundrids

(1) bundplade af stål
(2) slæde
(3) porcelænsplade 25 x 25 x 5 mm fastholdt på slæden
(4) fast porcelænsstift, 10 (diameter) x 15 mm
(5) prøve, ca. 10 $mm^3$

Figur 5b. Stiftens udgangsposition på prøven

(6) stiftholder
(7) belastningsarm
(8) kontravægt
(9) afbryder
(10) hjul til indstilling af slæden i udgangsstillingen
(11) til elmotor

▼B

## A.15. SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR VÆSKER OG GASSER

### 1. METODE

#### 1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test. Testproceduren kan anvendes for gasser, væsker og dampe, som kan antændes af en hed overflade under tilstedeværelse af luft.

Selvantændelsestemperaturen kan påvirkes betydeligt i nedadgående retning af katalytiske urenheder, af overfladematerialet og af en større testbeholder.

#### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Tendensen til selvantændelse udtrykkes ved selvantændelsestemperaturen. Selvantændelsestemperaturen er den laveste temperatur, ved hvilken teststoffet bryder i brand i blanding med luft under de i testmetoden definerede betingelser.

#### 1.3. REFERENCESTOFFER

I standarderne (se 1.6.3) er der nævnt referencestoffer. De skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kontrol af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

#### 1.4. METODENS PRINCIP

Ved metoden bestemmes den laveste temperatur af den indvendige overflade af et lukket rum, ved hvilken en gas, damp eller væske, der sprøjtes ind i rummet, bryder i brand.

#### 1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden afhænger af området for selvantændelsestemperaturen og af den anvendte testmetode.

Følsomheden og specificiteten afhænger af den anvendte testmetode.

#### 1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

##### 1.6.1. **Apparatur**

Apparaturet er beskrevet i den metode, der henvises til i 1.6.3.

##### 1.6.2. **Testbetingelser**

En prøve af stoffet testes i overensstemmelse med den metode, der henvises til i 1.6.3.

##### 1.6.3. **Udførelse af testen**

Se IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056 og NF T 20-037.

▼B

2. **DATA**

Testtemperaturen, atmosfæretrykket, den anvendte mængde prøvemateriale og tidsrummet, indtil der sker antændelse, registreres.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger

— nøjagtig beskrivelse af stoffet (betegnelse og urenheder)

— den anvendte testmængde og atmosfæretrykket

— det anvendte apparatur

— måleresultaterne (testtemperatur, resultaterne af antændelsen og det hertil svarende tidsrum)

— alle yderligere oplysninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

Ingen.

▼B

A.16. **RELATIV SELVANTÆNDELSESTEMPERATUR FOR FASTE STOFFER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Eksplosive stoffer og stoffer, der spontant bryder i brand i kontakt med luften, underkastes ikke denne test.

Formålet med denne test er at fremskaffe foreløbige oplysninger om faste stoffers selvantændelighed ved høj temperatur.

Hvis den varme, der udvikles enten ved stoffets reaktion med luften eller ved eksoterm dekomponering, ikke bortledes hurtigt nok til omgivelserne, sker der en opvarmning, der fører til selvantændelse. Selvantændelse kan derfor finde sted, når varmeproduktionen sker hurtigere end varmeafgivelsen.

Testmetoden egner sig til foreløbig screening af faste stoffer. Da antændelse og forbrænding af faste stoffer er meget kompleks, bør den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, kun benyttes til sammenligningsformål.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den selvantændelsestemperatur, der bestemmes ved denne metode, er den laveste omgivende temperatur udtrykt i °C, hvorved en bestemt mængde af et stof bryder i brand under veldefinerede betingelser.

1.3. REFERENCESTOF

Ingen.

1.4. METODENS PRINCIP

En bestemt mængde af teststoffet anbringes i en ovn ved stuetemperatur; medens ovntemperaturen hæves med 0,5 °C/min til smeltepunktet, dog højst til 400 °C, registreres temperaturen midt i prøven som funktion af tiden. I forbindelse med denne test benævnes den ovntemperatur, ved hvilken prøvens temperatur når op på 400 °C ved selvopvarmning, selvantændelsestemperaturen.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Apparatur**

1.6.1.1. *Ovn*

En temperaturprogrammeret laboratorieovn (volumen ca. 2 liter) med fri konvektion og eksplosionsaflastning. For at imødegå enhver eksplosionsfare må eventuelle dekomponeringsgasser ikke kunne komme i berøring med varmelegemet.

▼B

1.6.1.2. *Terning af ståltrådsnet*

Et stykke ståltrådsnet med maskevidden 0,045 mm skæres ud efter tegningen i figur 1. Det foldes til terninger, hvor den ene side er åben, og fastholdes med ståltråd.

1.6.1.3. *Termoelementer*

Egnede termoelementer.

1.6.1.4. *Skriver*

En to-kanals skriver, der er kalibreret op til 600 °C eller en tilsvarende spænding.

1.6.2. **Testbetingelser**

Stoffer testes i den form, de modtages i.

1.6.3. **Udførelse af testen**

Terningen fyldes med teststoffet, og der bankes let på den under tilsætning af mere af stoffet, indtil den er helt fyldt. Dernæst ophænges terningen midt i ovnen ved stuetemperatur. Det ene termoelement anbringes midt i terningen, det andet mellem terningen og ovnvæggen til måling af ovntemperaturen.

Ovntemperaturen og prøvetemperaturen registreres løbende, mens ovntemperaturen hæves til 400 °C, dog højst til stoffets smeltepunktet, med en hastighed på 0,5 °C/min.

Antændelse af stoffet vil vise sig som en meget stejl temperaturstigning i prøven sammenlignet med ovntemperaturen.

2. **DATA**

Den ovntemperatur, ved hvilken prøven som følge af selvopvarmning når op på en temperatur på 400 °C, er relevant for evaluering (se figur 2).

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— en beskrivelse af teststoffet

— måleresultaterne, herunder temperatur/tid-kurven

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

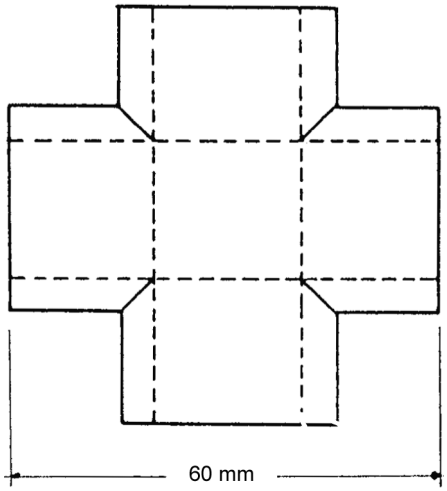
4. **HENVISNINGER**

NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

▼B

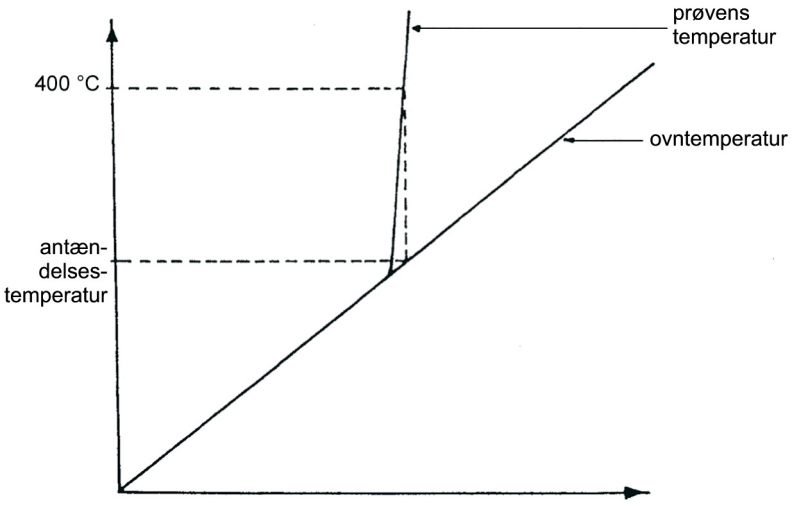
*Figur 1*

**Tegning af 20 mm testterning**




*Figur 2*

**Typisk temperatur/tid-kurve**



▼B

A.17. **OXIDERENDE EGENSKABER (FASTE STOFFER)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved udførelse af denne test er det nyttigt at have forhåndsoplysninger om stoffets eventuelle eksplosive egenskaber.

Denne test kan ikke anvendes på væsker, gasser, eksplosive og yderst let antændelige stoffer samt organiske peroxider.

Det er ikke nødvendigt at udføre denne test, hvis det på grundlag af strukturformelen kan godtgøres, at stoffet med stor sandsynlighed ikke kan reagere eksotermt med et brændbart materiale.

Der udføres en indledende test til konstatering af, om den egentlige test skal udføres under iagttagelse af særlige forsigtighedsregler.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Reaktionstid: den reaktionstid i sekunder, der kræves, for at reaktionszonen breder sig hen ad en vold, efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i 1.6.

Reaktionshastighed: udtrykkes i millimeter pr. sekund.

Største reaktionshastighed: den største af de reaktionshastigheder, der bestemmes med blandinger indeholdende 10 til 90 vægtprocent af det oxiderende stof.

1.3. REFERENCESTOF

Som referencestof til testen og screeningstesten benyttes bariumnitrat (analysekvalitet).

Referenceblandingen er den blanding af bariumnitrat og pulveriseret cellulose, fremstillet efter 1.6, som har den største reaktionshastighed (normalt en blanding indeholdende 60 vægtprocent bariumnitrat).

1.4. METODENS PRINCIP

Af sikkerhedshensyn udføres der en indledende screeningstest. Viser denne indledende test klart, at stoffet har oxiderende egenskaber, behøves der ikke yderligere testing. Er dette ikke tilfældet, underkastes stoffet en fuldstændig test.

Ved den fuldstændige test blandes teststoffet og et veldefineret brændbart stof i forskellige forhold. Hver blanding arrangeres i en vold, der antændes i den ene ende. Den største målte reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Alle påkrævede formalings- og blandemetoder kan anvendes under den forudsætning, at den største reaktionshastighed i hver af de seks enkeltforsøg ikke afviger fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelse**

1.6.1.1. *Teststof*

Prøven reduceres til en partikelstørrelse på < 0,125 mm på følgende måde: Teststoffet sigtes, hvorefter den tilbageholdte fraktion formales, og denne fremgangsmåde gentages, indtil hele testmængden har passeret sigten.

Alle formalings- og sigtemetoder, der opfylder kvalitetskriterierne, kan anvendes.

Før fremstilling af blandingen tørres stoffet ved 105 °C til konstant vægt. Hvis teststoffets dekomponeringstemperatur er lavere end 105 °C, tørres stoffet ved en passende lavere temperatur.

1.6.1.2. *Brændbart stof*

Som brændbart stof anvendes der pulveriseret cellulose af den type, der bruges til tyndtlagskromatografi eller søjlekromatografi. En type, hvor 85 % af fibrene har en længde på mellem 0,020 og 0,075 mm, har vist sig egnet. Cellulosepulveret sigtes på en sigte med en maskevidde på 0,125 mm. Der bruges cellulose fra samme batch til hele testen.

Før fremstilling af blandingen tørres cellulosepulveret ved 105 °C til konstant vægt.

Hvis der benyttes savsmuld til den indledende test, fremstilles dette ved opsamling af den fraktion, der passerer gennem en sigte med maskevidden 1,6 mm, omhyggelig blanding og tørring ved 105 °C i 4 timer i et højst 25 mm tykt lag. Efter afkøling opbevares savsmuldet i en lufttæt beholder, der fyldes så meget som praktisk muligt, indtil der bruges, helst inden 24 timer efter tørringen.

1.6.1.3. *Antændelseskilde*

Som antændelseskilde anvendes der en gasflamme (diameter mindst 5 mm). Anvendes der en anden antændelseskilde (f.eks. ved test i inert atmosfære), skal dette begrundes og kilden beskrives i rapporten.

1.6.2. **Udførelse af testen**

*Bemærk:*

Blandinger af oxiderende stoffer med cellulose eller savsmuld skal betragtes som potentielt eksplosive og behandles med passende forsigtighed.

1.6.2.1. *Indledende test*

2 vægtdele tørret stof blandes omhyggeligt med 1 vægtdel tørret cellulose eller savsmuld, og der tildannes en lille kegleformet bunke af blandingen med en grundfladediameter på 3,5 cm og en højde på 2,5 cm, ved at fylde blandingen løst i en kegleformet form (f.eks. en laboratorietragt med tilproppet stilk).

▼B

Bunken anbringes på en kold ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade. Testen udføres i stinkskab på samme måde som testen i 1.6.2.2.

Antændelseskilden bringes i berøring med bunken. Den efterfølgende reaktions voldsomhed og varighed iagttages og registreres.

Hvis reaktionen er voldsom, skal stoffet anses for oxiderende.

Hvis resultatet på nogen måde er tvetydigt, skal den nedenfor beskrevne fuldstændige udbredelsestest udføres.

1.6.2.2. *Udbredelsestest*

Der fremstilles en række blandinger af oxiderende stof og cellulose indeholdende fra 10 til 90 vægtprocent oxiderende stof og med intervaller på 10 vægtprocent. I grænsetilfælde anvendes der blandinger derimellem, så den største reaktionshastighed bestemmes mere nøjagtigt.

Volden tildannes ved hjælp af en 250 mm lang metalform, der har trekantet tværsnit med indvendig højde 10 mm og bredde 20 mm. På hver side af formen i længderetningen er der anbragt en metalplade, der rager 2 mm op over det trekantede tværsnits overkant (se figuren). Denne indretning fyldes løst med et lille overskud af blandingen. Efter at man har ladet formen falde ned på et fast underlag fra 2 cm's højde en gang, skrabes overskuddet af med en skråtstillet plade. Sidestykkerne fjernes, og det resterende pulver glattes ud med en valse. Der lægges en ikke-brændbar ikke-porøs dårligt varmeledende plade oven på formen, det hele vendes om, og formen fjernes.

Volden anbringes i et stinkskab på tværs af luftstrømmen.

Lufthastigheden skal være tilstrækkelig til at forhindre, at røgen slipper ud i laboratoriet, og må ikke ændres under testen. Omkring apparatet opstilles der en skærm til beskyttelse mod træk.

Da cellulose og visse teststoffer er hygroskopiske, skal testen udføres så hurtigt som muligt.

Volden antændes i den ene ende ved berøring med en flamme.

Når reaktionszonen har forplantet sig 30 mm, måles dens udbredelseshastighed over de næste 200 mm.

Testen udføres med referencestoffet og mindst én gang med hver af blandingerne af teststof med cellulose.

Hvis den fundne største reaktionshastighed er væsentligt større end referenceblandingens, kan testen afbrydes; i modsat fald gentages forsøget fem gange med hver af de tre blandinger, der giver den største reaktionshastighed.

▼B

Hvis der er mistanke om, at der er fremkommet et falsk positivt resultat, gentages testen med et inert materiale med tilsvarende partikelstørrelse i stedet for cellulosen, f.eks. kiselgur. Alternativt kan den blanding af teststof og cellulose, som har den højeste reaktionshastighed, testes i inert atmosfære (< 2 % v/v oxygen).

2. **DATA**

Af sikkerhedshensyn anses den største reaktionshastighed — og ikke gennemsnittet — for at være den karakteristiske oxiderende egenskab ved det undersøgte stof.

Den højeste værdi af reaktionshastigheden af en serie på seks forsøg med en given blanding er relevant for vurderingen.

Hver enkelt blandings højeste reaktionshastighed afbildes mod koncentrationen af oxiderende stof. Den største reaktionshastighed aflæses på kurven.

De seks værdier af reaktionshastigheden, som er fundet med den blanding, der har den største reaktionshastighed, må ikke afvige fra det aritmetiske gennemsnit med mere end 10 %; i modsat fald må formalings- og blandemetoderne forbedres.

Den fundne største reaktionshastighed sammenlignes med referenceblandingens største reaktionshastighed (se 1.3).

Hvis der udføres test i inert atmosfære, sammenlignes den største reaktionshastighed med referenceblandingens største reaktionshastighed bestemt i inert atmosfære.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— det undersøgte stofs identitet, sammensætning, renhedsgrad, vandindhold, m.v.

— eventuel behandling af prøven (f.eks. formaling eller tørring)

— den benyttede antændelseskilde

— måleresultaterne

— reaktionsforløbet (f.eks. forbrænding med flammer fra overfladen, gennembrænding af hele materialet og oplysninger om forbrændingsprodukter)

— alle yderligere bemærkninger, der er relevante for fortolkningen af resultaterne, herunder en beskrivelse af reaktionens voldsomhed (flamme, gnister, røg, ulmen, m.v.) og omtrentlige varighed i den indledende sikkerheds/screeningstest, både af test- og referencestoffet

— resultaterne af test med et inert stof

— eventuelle resultater af test i inert atmosfære.

▼B

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Et stof skal anses for oxiderende, hvis

a) der sker voldsom reaktion under den indledende test

b) den største reaktionshastighed af de blandinger, der er undersøgt ved fuldstændig testning, er højere end eller lige så høj som referenceblandingens (dvs. cellulose og bariumnitrat) største reaktionshastighed.

For at undgå falske positive resultater skal de resultater, der opnås ved test af stoffet med et inert materiale og/eller i inert atmosfære, også tages i betragtning ved fortolkningen af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

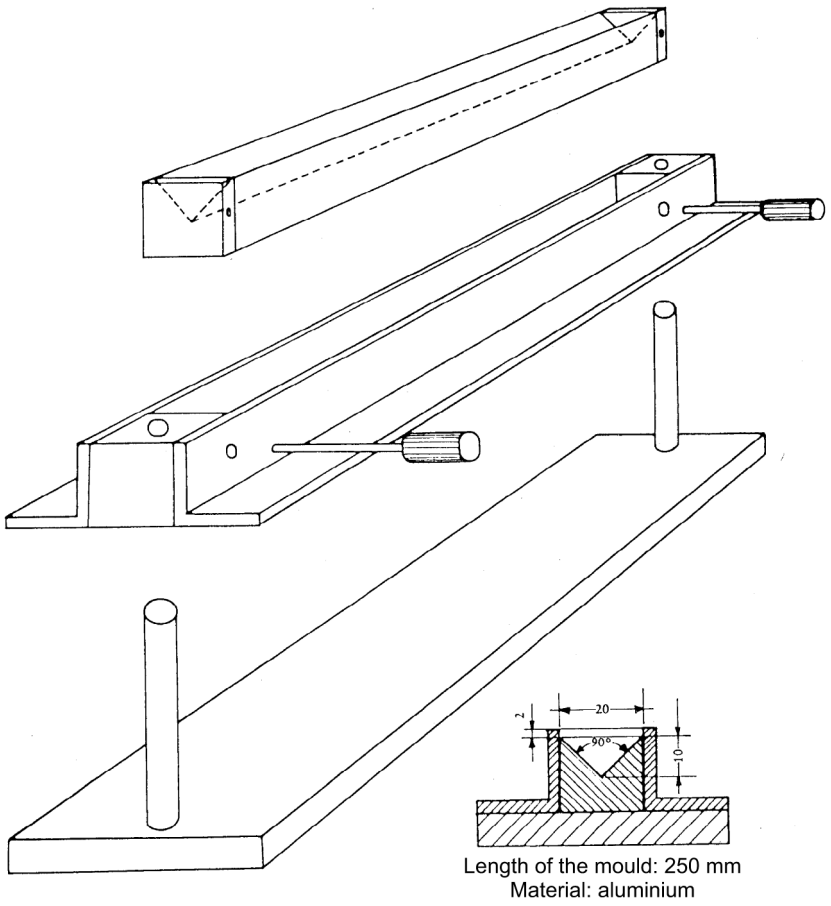
▼B

*TILLÆG*

*Figur*

**Form og tilbehor til fremstilling af provolden**

(alle dimensioner i mm)



▼B

A.18. **POLYMERERS ANTALSMIDDELMOLEKYLVÆGT OG MOLEKYLVÆGTSFORDEL ING**

1. **METODE**

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 118 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i henvisning (1).

1.1. INDLEDNING

Da polymerer kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymerer. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se tillægget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystyrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymerer, f.eks. vandopløselige polymerer og langkædede forgrenede polymerer, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Antalsmiddelmolekylvægten $M_n$ og vægtmiddelmolekylvægten $M_w$ bestemmes ved følgende udtryk:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

hvor

$H_i$ er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen $V_i$

$M_i$ er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen $V_i$

n er antallet af datapunkter.

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet $M_w/M_n$.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte Mn og Mw og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både $M_n$ og $M_w$) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker, mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porerne, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymerer med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

▼B

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske:

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |

($M_p$ er standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Fremstilling af standardopløsninger af polystyren**

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. **Fremstilling af testopløsning**

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF), ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2 µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

1.6.3. **Apparatur**

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

▼B

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder.

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.4. **Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem**

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.5. **Kolonne**

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

1.6.6. **Teoretiske bunde**

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelse, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et andet passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{eller} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

hvor

$N$ = er antallet af teoretiske bunde

$V_e$ = er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

▼B

W = er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ = er toppens bredde i halv højde

1.6.7. **Adskillelseseffektiviteten**

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Kolonnens tværsnit}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

hvor

$V_{e,\,Mx}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten $M_x$

$V_{e,(10.Mx)}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

hvor

$V_{e1}$ og $V_{e2}$ = er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

$W_1$ og $W_2$ = er toppenes bredde ved basislinjen

$M_1$ og $M_2$ = er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

1.6.8. **Opløsningsmidler**

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.9. **Temperaturregulering**

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR- eller viskositetsdetektor.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig.

$M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$ og $M_p$ anføres for hver måling. Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log $M_p$ ($M_p$ er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Antals- og vægtmiddelmolekylvægten bestemmes i reglen ved elektronisk databehandling på grundlag af udtrykkene i punkt 1.2. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536/91 (3).

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. **Teststof:**

— foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

▼B

— beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. **Instrumenter:**

— beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— oplysninger om toppenes symmetri

— kolonnetemperatur, temperaturregulering

— detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. **Kalibrering af systemet:**

— detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

— oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater)

— oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen

— alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene $M_p$, $M_n$, $M_w$ og $M_w/M_n$, som oplyst af fabrikanten eller udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — injektionsvolumen og -koncentration

▼B

— benyttet $M_p$-værdi ved kalibrering

— elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

— $M_p$-værdi beregnet ved topmaksimum

— procentvis fejl på den beregnede $M_p$-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. **Evaluering:**

— evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, m.v.)

— oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

— injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml)

— iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. **HENVISNINGER**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Tillæg*

**Eksempler på andre metoder til bestemmelse af antalsmiddelmolekylvægt ($M_n$) for polymerer**

Gelpermeationskromatografi er den foretrukne metode til bestemmelse af $M_n$, især når der er rådighed over et sæt standarder med tilnærmelsesvis samme struktur som den pågældende polymer. Hvis der er praktiske problemer med at udføre GPC, eller hvis der allerede er en formodning om, at stoffet ikke kan opfylde det fastsatte $M_n$-kriterium (og dette ønskes bekræftet), er der alternative metoder til rådighed, f.eks.:

1. **Brug af kolligative egenskaber**

1.1. Ebullioskopi/kryoskopi

består i at måle et opløsningsmiddels kogepunktsforhøjelse (ebullioskopi) eller frysepunktssænkning (kryoskopi), når polymeren tilsættes. Metoden bygger på, at den opløste polymers indvirkning på væskens kogepunkt/frysepunkt afhænger af dens molekylvægt (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

1.2. Damptrykssænkning

består i at måle damptrykket af en valgt referencevæske før og efter tilsætning af en kendt mængde polymer (1) (2).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$ (teoretisk; i praksis dog af begrænset værdi).

1.3. Membranosmometri

bygger på det osmotiske princip, dvs. opløsningsmiddelmolekylers naturlige tendens til at passere gennem en semipermeabel membran fra en tynd til en mere koncentreret opløsning for at etablere ligevægt. Ved testen har den tynde opløsning en koncentration på nul, mens den mere koncentrerede opløsning indeholder polymeren. Opløsningsmidlets bevægelse gennem membranen giver en trykforskel, der afhænger af polymerens koncentration og molekylvægt (1) (3) (4).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$-$200\,000$.

1.4. Vapour Phase Osmometry

Gasfaseosmometri består i at sammenligne fordampningshastigheden i en ren opløsningsmiddelaerosol med mindst tre aerosoler, der indeholder den pågældende polymer i forskellige koncentrationer (1) (5) (6).

Anvendelsesområde: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Endegruppeanalyse**

For at kunne bruge denne metode skal man have kendskab både til polymerens overordnede struktur og til kædetermineringsgruppernes karakter (endegrupperne skal kunne skelnes fra hovedskelettet ved f.eks. NMR eller titrering/derivatisering). Ved bestemmelse af den molekylære koncentration af endegrupper i polymeren kan man nå frem til en værdi for molekylvægten (7) (8) (9).

Anvendelsesområde: $M_n$ op til 50 000 (idet pålideligheden aftager).

3. **Henvisninger**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **POLYMERERS INDHOLD AF LAVMOLEKYLÆRE BESTANDDELE**

1. **METODE**

Denne gelpermeationskromatografiske metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 119 (1996). Grundprincipper og yderligere tekniske oplysninger findes i henvisningerne.

1.1. INDLEDNING

Da polymerer kan have vidt forskellige egenskaber, er det umuligt at beskrive én metode med nøjagtig angivelse af alle betingelser for adskillelse og evaluering, som dækker alle tænkelige særtilfælde, der kan forekomme under adskillelse af polymerer. Især er komplekse polymersystemer ofte uegnede til gelpermeationskromatografi (GPC). Er det ikke praktisk muligt at foretage GPC, kan molekylvægten bestemmes ved andre metoder (se tillægget). I så fald skal der gives en begrundelse for valget af metode og en fuldstændig beskrivelse af den.

Den beskrevne metode er baseret på DIN-standard 55672 (1). Heri findes der detaljerede oplysninger om, hvordan forsøgene udføres, og hvordan dataene evalueres. Hvis det bliver nødvendigt at ændre på forsøgsbetingelserne, skal disse ændringer begrundes. Der kan benyttes andre standarder, hvis der gives nøjagtige henvisninger dertil. I den beskrevne metode benyttes der polystrenprøver med kendt polydispersitet til kalibrering; for visse polymerer, f.eks. vandopløselige polymerer og langkædede forgrenede polymerer, kan det være nødvendigt at ændre på dette.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Lavmolekylære bestanddele defineres arbitrært som bestanddele med en molekylvægt på mindre end 1 000 dalton.

Antalsmiddelmolekylvægten $M_n$ og vægtmiddelmolekylvægten $M_w$ bestemmes ved følgende udtryk:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

hvor

$H_I$ = er detektorsignalets højde over basislinjen ved retentionsvolumen $V_i$

$M_i$ = er molekylvægten af polymerfraktionen ved retentionsvolumen $V_i$, og n er antallet af datapunkter

Bredden af molekylvægtsfordelingen, som er et mål for systemets dispersitet, er givet ved forholdet $M_w/M_n$.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

Da GPC er en relativ metode, må der foretages en kalibrering. Hertil benyttes der normalt lineære polystyrenstandarder med kendte middelmolekylvægte $M_n$ og $M_w$ og kendt snæver molekylvægtsfordeling. Kalibreringskurven kan kun benyttes til bestemmelse af molekylvægten af den ukendte prøve, hvis der er valgt identiske betingelser for separation af prøven og standarden.

Den sammenhæng mellem molekylvægt og elueringsvolumen, der bestemmes, gælder kun for de særlige betingelser ved det bestemte forsøg. Disse betingelser er først og fremmest temperatur, opløsningsmiddel (eller opløsningsmiddelblanding), kromatograferingsbetingelser og adskillelseskolonne eller -kolonnesystem.

Den molekylvægt, der på denne måde bestemmes for prøven, er relativ og betegnes »polystyrenækvivalent molekylvægt«. Det betyder, at molekylvægten kan afvige mere eller mindre fra den absolutte værdi, afhængigt af strukturmæssige og kemiske forskelle mellem standard og prøve. Hvis der benyttes en anden standard, f.eks. polyethylenglycol, polyethylenoxid, polymethylmethacrylat eller polyacrylsyre, skal dette begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Både molekylvægtfordelingen og middelmolekylvægten af prøven (både $M_w$ og $M_n$) kan bestemmes ved GPC. GPC er en særlig type væskekromatografi, hvor prøvens bestanddele adskilles efter hydrodynamisk volumen (2).

Adskillelsen sker, mens prøven passerer gennem en kolonne med porøst materiale, typisk en organisk gel. Små molekyler kan trænge ind i porerne, mens store molekyler ikke kan. På denne måde får de store molekyler en kortere vejlængde, så de elueres først. Mellemstore molekyler trænger ind i nogle af porerne og elueres senere. De mindste molekyler, hvis hydrodynamiske radius er mindre end gelens porer, kan trænge ind i alle porer og elueres sidst.

I den ideelle situation er kun molekylernes størrelse bestemmende for adskillelsen, men i praksis er det umuligt helt at undgå interferens fra absorption. Uensartet kolonnepakning og dødvolumener kan forværre dette forhold (2).

Detektoren arbejder med f.eks. brydningsindeks eller UV-absorption og giver en simpel fordelingskurve. For at få hæftet faktiske molekylvægtsværdier på kurven, må kolonnen kalibreres ved at lede polymerer med kendt molekylvægt og helst stort set samme struktur, f.eks. forskellige polystyrenstandarder, gennem den. Resultatet er typisk en gauss-kurve, undertiden trukket ud i en lille hale i den lavmolekylære ende, hvor den lodrette akse viser mængden (i vægt) af de forskellige eluerede molekyler, og den vandrette akse viser logaritmen til molekylvægten.

▼B

Af denne kurve udledes indholdet af lavmolekylære bestanddele. Beregningen er kun nøjagtig, hvis de lavmolekylære bestanddele modsvarer polymeren som helhed på massebasis.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Repeterbarheden (den relative standardafvigelse) bør være mindre end 0,3 % for det eluerede volumen. Den krævede repeterbarhed for analysen skal sikres ved korrektion med intern standard, hvis et kromatogram evalueres tidsafhængigt og ikke opfylder ovennævnte kriterium (1). Polydispersiteten afhænger af standardernes molekylvægt. For polystyrenstandarder er følgende værdier typiske

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |

$M_p$ et standardens molekylvægt ved toppens maksimum)

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Fremstilling af standardopløsninger af polystyren**

Polystyrenstandarderne opløses ved omhyggelig blanding med det valgte elueringsmiddel. Ved fremstillingen skal der nøje tages hensyn til producentens anvisninger.

Hvilken koncentration der vælges, afhænger af forskellige faktorer, f.eks. injektionsvolumen, opløsningens viskositet og detektorens følsomhed. Det maksimale injektionsvolumen skal tilpasses til kolonnens længde, så man undgår overbelastning. Typisk er injektionsvolumen for en GPC-kolonne på 30 cm × 7,8 mm normalt mellem 40 og 100 µl til analytisk separation. Større rumfang kan tillades, men det bør ikke overstige 250 µl. Det optimale forhold mellem injektionsvolumen og koncentration må fastlægges inden den egentlige kalibrering af kolonnen.

1.6.2. **Fremstilling af testopløsning**

I princippet gælder der samme krav ved fremstilling af testopløsningen. Prøven opløses i et egnet opløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF) ved omhyggelig omrystning. Der må under ingen omstændigheder benyttes ultralydbad til opløsningen. Om nødvendigt kan testopløsningen renses på membranfilter med en porestørrelse mellem 0,2 og 2 µm.

I den endelige rapport skal det oplyses, om der er uopløste partikler til stede, idet det kan skyldes højmolekylære bestanddele. Der benyttes en egnet metode til at bestemme den procentvise vægtmængde af de uopløste partikler. Opløsningerne benyttes inden for et døgn.

▼B

1.6.3. **Korrektion for indhold af urenheder og additiver**

Det er normalt nødvendigt at korrigere indholdet af bestanddele med M < 1 000 for bidrag fra ikke-polymere bestanddele (f.eks. urenheder og/eller additiver), medmindre der allerede er målt et indhold på < 1 %. Dette gøres ved direkte analyse på polymeropløsningen eller GPC-eluatet.

Hvis eluatet efter passage af kolonnen er for fortyndet til yderligere analyse, må det koncentreres. Det kan være nødvendigt at inddampe eluatet til tørhed og genopløse det. Eluatet skal koncentreres på en sådan måde, at der med sikkerhed ikke sker ændringer i det. Behandlingen af eluatet efter GPC-trinnet vil afhænge af, hvilken analysemetode der anvendes til kvantitativ bestemmelse.

1.6.4. **Apparatur**

GPC-udstyr bestående af følgende komponenter:

— opløsningsmiddelbeholder

— afgasningsapparat (hvis påkrævet)

— pumpe

— pulsdæmper (hvis påkrævet)

— injektionssystem

— kromatografikolonner

— detektor

— flowmeter (hvis påkrævet)

— skriver/databehandlingsenhed

— affaldsbeholder

Det skal sikres, at GPC-systemet er ufølsomt over for de anvendte opløsningsmidler (f.eks. ved brug af kapillarrør af stål til THF).

1.6.5. **Injektions- og opløsningsmiddeltilførselssystem**

Der sættes et veldefineret volumen af prøveopløsningen på kolonnen, enten med en autosampler eller manuelt i en skarpt afgrænset zone. For hurtig tilbagetrækning eller indtrykning af stemplet i injektionssprøjten ved manuel indsprøjtning kan medføre ændringer i den iagttagne molekylvægtsfordeling. Systemet for tilførsel af opløsningsmiddel skal så vidt muligt være pulsationsfrit, helst indeholde en pulsdæmper. Flowet skal være omkring 1 ml/min.

1.6.6. **Kolonne**

Afhængigt af prøven karakteriseres polymeren enten på en enkelt kolonne eller på flere serieforbundne kolonner. I handelen fås en række porøse kolonnematerialer med veldefinerede egenskaber (f.eks. porestørrelse og øvre og nedre grænse). Valget af separationsgel og kolonnelængde afhænger af prøvens egenskaber (hydrodynamisk volumen og molekylvægtsfordeling) og af de specifikke adskillelsesbetingelser såsom opløsningsmiddel, temperatur og flowhastighed (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Teoretiske bunde**

Den kolonne eller kolonnekombination, der benyttes til adskillelsen, skal karakteriseres ved antallet af teoretiske bunde. Ved brug af THF som opløsningsmiddel gøres dette ved, at man sætter en opløsning af ethylbenzen eller et anden passende ikke-polært opløst stof på en kolonne af kendt længde. Antallet af teoretiske bunde er givet ved følgende udtryk:

$$N = 5,54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{eller} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

hvor,

N = er antallet af teoretiske bunde

$V_e$ = er elueringsvolumenet ved toppens maksimum

W = er toppens bredde ved basislinjen

$W_{1/2}$ = er toppens bredde i halv højde

1.6.8. **Adskillelsereffektiviteten**

Ud over antallet af teoretiske bunde, som er en størrelse, der bestemmer båndbredden, spiller også adskillelseseffektiviteten en rolle, og den bestemmes ved kalibreringskurvens stejlhed. En kolonnes adskillelseseffektivitet er givet ved følgende sammenhæng:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{Kolonnens tværsnit}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

hvor

$V_{e,\,Mx}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med molekylvægten $M_x$

$V_{e,(10.Mx)}$ = er elueringsvolumenet for polystyren med en ti gange så høj molekylvægt

Systemets adskillelsesevne defineres normalt som følger:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

hvor

$V_{e1}$ og $V_{e2}$ = er elueringsvolumen for de to polystyrenstandarder ved toppenes maksimum

$W_1$ og $W_2$ = er toppenes bredde ved basislinjen

$M_1$ og $M_2$ = er molekylvægtene ved toppenes højde (normalt en forskel på en faktor 10).

R-værdien for kolonnesystemet bør være større end 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Opløsningsmidler**

Alle opløsningsmidler skal være af høj renhed (for THF en renhedsgrad på 99,5 %). Opløsningsmiddelbeholderen (om nødvendigt med inert atmosfære) skal rumme tilstrækkelig meget til, at kolonnen kan kalibreres, og der kan analyseres flere prøver. Opløsningsmidlet skal afgasses, inden det pumpes videre til kolonnen.

1.6.10. **Temperaturregulering**

Temperaturen i de kritiske komponenter (injektionssløjfe, kolonner, detektor og rør og slanger) skal være konstant og passe til det valgte opløsningsmiddel.

1.6.11. **Detektor**

Detektoren har til formål at give et kvantitativt mål for koncentrationen af teststoffet i eluatet fra kolonnen. For at gøre den uundgåelige forbredning af toppene mindst mulig skal detektorcellens volumen være så lille som muligt. Det må ikke være større end 10 µl, undtagen for detektorer baseret på lysspredning og viskositet. Sædvanligvis benyttes der differentialrefraktometri til detektering. Hvis særlige egenskaber ved prøve eller elueringsmiddel kræver det, kan der benyttes andre detektortyper, f.eks. UV/VIS-, IR-eller viskositetsdetektor.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Der henvises til DIN-standarden (1) for så vidt angår detaljerede evalueringskriterier og krav til dataindsamling og -behandling.

Der udføres to uafhængige forsøg med hver prøve. De analyseres hver for sig. Det er i alle tilfælde vigtigt også at bestemme data for blindprøver, der er behandlet på samme måde som prøven.

Det skal udtrykkelig anføres, at de målte værdier er relative værdier svarende til den benyttede standards molekylvægt.

Efter at retentionsvolumen eller retentionstid (eventuelt korrigeret ved hjælp af intern standard) er bestemt, afbildes værdier af log $M_p$ ($M_p$ er maksimum for kalibreringsstandardens top) mod en af disse størrelser. Der kræves mindst to kalibreringspunkter i hver molekylvægtsdekade og mindst fem målepunkter for hele kurven; sidstnævnte bør spænde over prøvens formodede molekylvægt. Slutpunktet i kalibreringskurvens lavmolekylære ende fastlægges ved n-hexylbenzen eller et andet passende ikke-polært stof. Den del af kurven, der svarer til molekylvægte under 1 000, bestemmes og korrigeres efter behov for urenheder og additiver. Elueringskurverne evalueres i reglen ved elektronisk databehandling. Til brug for manuel behandling er der yderligere oplysninger i ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Uopløselig polymer, der måtte være tilbageholdt på kolonnen, vil efter al sandsynlighed have en molekylvægt, der er større end den opløselige fraktions, så hvis den lades ude af betragtning, vil indholdet af lavmolekylære bestanddele blive anslået for højt. I tillægget er der en vejledning i, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer.

Fordelingskurven skal forelægges i form af en tabel eller en figur (frekvens eller kumulativ sum mod log M). I en grafisk fremstilling skal en molekylær dekade normalt svare til ca. 4 cm i bredden, og den maksimale tophøjde skal være ca. 8 cm høj. I tilfælde af en integreret fordeling skal forskellen mellem 0 og 100 % på ordinaten være ca. 10 cm.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

2.2.1. **Teststof:**

— Foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder)

— Beskrivelse af behandling af prøven, iagttagelser, problemer.

2.2.2. **Instrumenter:**

— Beholder til elueringsmiddel, inert gas, afgasning af elueringsmiddel, elueringsmidlets sammensætning, urenheder

— Pumpe, pulsdæmper, injektionssystem

— Separationskolonner (fabrikat, alle specifikationer for kolonnen, såsom porestørrelse og separationsmaterialets art, samt antal, længde og rækkefølge af de anvendte kolonner)

— Antal teoretiske bunde i kolonnen (eller kolonnekombinationen), adskillelseseffektivitet (systemets adskillelsesevne)

— Oplysninger om toppenes symmetri

— Kolonnetemperatur, temperaturregulering

— Detektor (måleprincip, type, cellevolumen)

— Eventuelt flowmeter (fabrikat, måleprincip)

— Dataopsamlings- og databehandlingssystem (hardware og software).

2.2.3. **Kalibrering af systemet:**

— Detaljeret beskrivelse af den metode, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven

▼B

— Oplysninger om kvalitetskriterier for metoden (f.eks. korrelationskoefficient, sum af afvigelsers kvadrater

— Oplysninger om alle ekstrapoleringer, forudsætninger og tilnærmelser, der er gjort under forsøget og dataevalueringen og -behandlingen

— Alle målinger, der er benyttet til fremstilling af kalibreringskurven, skal dokumenteres i en tabel, som indeholder følgende oplysninger om hvert enkelt kalibreringspunkt:

  — prøvens navn

  — fabrikant

  — karakteristiske værdier af parametrene $M_p$, $M_n$, $M_w$, og $M_w/M_n$, som oplyst af fabrikanten udledt ved efterfølgende målinger samt detaljerede oplysninger om målemetoden

  — injektionsvolumen og -koncentration

  — benyttet $M_p$-værdi ved kalibrering

  — elueringsvolumen eller korrigeret retentionstid målt ved topmaksimum

  — $M_p$-værdi beregnet ved topmaksimum

  — procentvis fejl på den beregnede $M_p$-værdi og kalibreringsværdien.

2.2.4. **Oplysninger om indholdet af lavmolekylære bestanddele:**

— beskrivelse af de metoder, der er benyttet til analysen, og hvordan forsøgene er udført

— oplysninger om det procentvise indhold (w/w) af lavmolekylære bestanddele i forhold til hele prøven

— oplysninger om urenheder, additiver og andre ikke-polymere bestanddele i vægtprocent i forhold til hele prøven

2.2.5. **Evaluering:**

— Evaluering på tidsbasis: angivelse af, hvilke metoder der benyttes til at sikre den krævede reproducerbarhed (korrektionsmetode, intern standard, m.v.)

— Oplysninger om, om evalueringen er foretaget på grundlag af elueringsvolumen eller retentionstid

— Oplysninger om begrænsningerne for evalueringen, hvis en top ikke er fuldstændigt analyseret

— Beskrivelse af eventuelle udglatningsmetoder

— Procedurer for tilberedning og forbehandling af prøven

— Tilstedeværelse af eventuelle uopløste partikler

▼B

— Injektionsvolumen (µl) og injektionskoncentration (mg/ml)

— Iagttagelser, der tyder på afvigelser fra den ideelle GPC-profil

— Detaljeret beskrivelse af alle ændringer i testproceduren

— Detaljerede oplysninger om usikkerhedsintervaller

— Alle øvrige oplysninger og iagttagelser, der er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3. **HENVISNINGER**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Tillæg*

**Vejledning i, hvordan indholdet af lavmolekylære bestanddele korrigeres for uopløselig polymer**

Indhold af uopløselig polymer i prøven vil medføre et vist massetab under GPC-analysen. Den uopløselige polymer tilbageholdes irreversibelt på kolonnen eller prøvefiltret, mens den opløselige del af prøven passerer gennem kolonnen. Hvis tilvæksten i polymerens brydningsindeks (dn/dc) kan skønnes eller måles, kan man få et skøn over, hvor stor en masse der er gået tabt på kolonnen. I så fald foretages korrektionen ved hjælp af en ekstern kalibrering med standardmaterialer med kendt koncentration og dn/dc, så refraktometerets udslag kalibreres. I nedenstående eksempel er der benyttet en standard af poly (methylmethacrylat) (pMMA).

Ved ekstern kalibrering med henblik på analyse af acrylpolymere analyseres en pMMA-standard med kendt koncentration i tetrahydrofuran ved GPC, og de fremkomme data benyttes til bestemmelse af refraktometerkonstanten efter følgende udtryk:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

hvor

K = er refraktometerkonstanten (i mikrovolt-sekund/ml)

R = er pMMA-standardens udslag (mikrovolt-sekund)

C = er pMMA-standardens koncentration (i mg/ml)

V = er injektionsvolumenet (i ml), og

dn/dc = er brydningsindekstilvæksten for pMMA i tetrahydrofuran (i ml/mg)

Følgende data er typiske for en pMMA-standard:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = $9 \times 10^{-5}$ ml/mg

Den fremkomne K-værdi på $3{,}05 \times 10^{11}$ benyttes derefter til beregning af det teoretiske detektorudslag, hvis 100 % af polymeren elueres gennem detektoren.

▼B

A.20. **POLYMERERS OPLØSELIGHED/EKSTRAHERBARHED I VAND**

1. **METODE**

Den beskrevne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 120 (1997). Yderligere tekniske oplysninger findes i henvisning (1).

1.1. INDLEDNING

For visse polymerer, f.eks. emulsionspolymerer, kan det være nødvendigt at gøre yderligere forberedelser, inden den nedenfor beskrevne metode kan benyttes. Metoden kan ikke anvendes for flydende polymerer og polymerer, der kan reagere med vand under testbetingelserne.

Når metoden ikke er bekvem eller er umulig at benytte, må opløseligheden/ekstraherbarheden undersøges ved andre metoder. I så fald skal gives alle detaljer og en begrundelse for valget af metode.

1.2. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vandigt medium bestemmes ved hjælp af kolbemetoden (jf. A.6 Vandopløselighed — kolbemetoden) med de i det følgende beskrevne ændringer.

1.4. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Udstyr**

Der er brug for følgende udstyr til metoden:

— findelingsapparat, f.eks. mølle, til fremstilling af partikler med kendt størrelse

— rysteapparat med mulighed for temperaturregulering

— membranfilter

— egnet analyseudstyr

— standardsigter

1.5.2. **Prøveforberedelse**

En repræsentativ prøve skal først findeles til en partikelstørrelse mellem 0,125 og 0,25 mm bestemt med passende sigter. Af hensyn til prøvens stabilitet, kan køling være påkrævet under formalingen. Materialer af gummiagtig karakter kan knuses ved flydende nitrogens temperatur (1).

Hvis det ikke er muligt at nå ned på den krævede partikelstørrelse, skal der tilstræbes den mindst mulige partikelstørrelse, og det opnåede resultat anføres. Det oplyses i rapporten, hvordan den findelte prøve har været opbevaret indtil udførelse af testen.

▼B

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Der afvejes 3 prøver på hver 10 g af teststoffet i 3 glaskolber med glasprop, og der tilsættes 1 000 ml vand til hver kolbe. Hvis det ikke er praktisk muligt at håndtere 10 g af polymeren, anvendes den største mængde, der kan håndteres, og vandmængden reduceres tilsvarende.

Kolberne lukkes tæt til og omrystes ved 20 °C. Der benyttes en anordning, der kan arbejde ved konstant temperatur. Efter 24 timer centrifugeres eller filtreres indholdet af hver enkelt kolbe, og polymerkoncentrationen i den klare vandfase bestemmes med en passende analysemetode. Findes der ingen passende analysemetoder for vandfasen, kan den samlede opløselighed/ekstraherbarhed skønnes ud fra den tørre vægt af filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen.

Normalt er det nødvendigt at skelne kvantitativt mellem urenheder og additiver på den ene side og lavmolekylære forbindelser på den anden side. Ved gravimetrisk bestemmelse er det ligeledes vigtigt at medtage en blindprøve uden teststof, så der tages højde for restmateriale hidrørende fra forsøgets udførelse.

Polymerers opløselighed/ekstraherbarhed i vand ved 37 °C ved pH 2 og pH 9 kan bestemmes som beskrevet ved udførelse af eksperimentet ved 20 °C. pH indstilles ved hjælp af egnede bufferopløsninger, syrer eller baser, f.eks. saltsyre, eddikesyre, natrium- eller kaliumhydroxid af analysekvalitet eller ammoniak.

Der udføres en eller to prøver, afhængigt af den benyttede analysemetode. Når der findes tilstrækkelig specifikke metoder til direkte analyse af vandfasen for polymerkomponenten, skulle én prøve som ovenfor beskrevet være tilstrækkeligt. Hvis der derimod ikke findes sådanne metoder og polymerens opløselighed/ekstraherbarhed må bestemmes indirekte ved analyse af det vandige ekstrakts indhold af organisk kulstof i alt (TOC), bør der udføres endnu en prøve. Prøven bør gentages endnu en gang, denne gang med en ti gange mindre polymermængde men samme vandmængde som ved den første prøve.

1.5.4. **Analyse**

1.5.4.1. *Test udført med kun én prøvestørrelse*

I nogle tilfælde findes der metoder til direkte analyse af polymerkomponenter i vandfasen. Alternativt kan man overveje indirekte at analysere for opløste/ekstraherede polymerkomponenter ved at bestemme den samlede mængde opløste bestanddele og korrigere for ikke-polymerspecifikke komponenter.

Analyse af vandfasen for samtlige polymerforbindelser kan foretages ved

enten en tilstrækkelig følsom metode, f.eks.

— TOC-bestemmelse ved nedbrydning til $CO_2$ med persulfat eller dichromat efterfulgt af måling ved IR eller kemisk analyse

▼B

— atomabsorptionsspektrometri (AAS) eller induktivt koblet plasmaemissionsspektrometri (ICP) for silicium- eller metalholdige polymerer

— UV-absorption ellerr spektrofluorimetri for arylpolymerer

— LC-MS for lavmolekylære prøver

eller ved vakuuminddampning af det vandige ekstrakt til tørhed og analyse af remanensen ved spektroskopi (IR, UV m.v.) eller AAS/ICP.

Hvis det ikke er praktisk muligt at gennemføre en analyse af selve vandfasen, ekstraheres vandekstraktet med et organisk opløsningsmiddel, der ikke er blandbart med vand, f.eks. en chloreret kulbrinte. Derefter afdampes opløsningsmidlet, og remanensen analyseres som ovenfor for indhold af den pågældende polymer. Bestanddele i denne remanens, som identificeres som urenheder eller additiver, fratrækkes, når selve polymerens opløselighed/ekstraherbarhed beregnes.

Når der er forholdsvis store stofmængder til stede, kan det være nødvendigt at foretage f.eks. HPLC- eller GC-analyse af remanensen for at skelne urenheder fra monomere og monomerderivater, så det virkelige indhold af sidstnævnte kan bestemmes.

I nogle tilfælde vil simpel afdampning af det organiske opløsningsmiddel og vejning af den tørre remanens være tilstrækkeligt.

1.5.4.2. *Test udført med to forskellige prøvestørrelser*

Alle vandige ekstrakter analyseres for TOC.

Der foretages gravimetrisk bestemmelse af den del af prøven, der ikke er gået i opløsning. Hvis der efter centrifugering eller filtrering af de enkelte kolbers indhold stadig sidder polymerrester fast på kolbens væg, skylles kolben med filtratet, indtil der ikke længere er synlige rester i kolben. Derefter centrifugeres eller filtreres filtratet igen. Filterkagen eller bundfaldet fra centrifugeringen tørres ved 40 °C under vakuum og vejes. Tørringen fortsættes til konstant vægt.

2. **DATA**

2.1. TEST UDFØRT MED KUN ÉN PRØVESTØRRELSE

Resultaterne for hver enkelt kolbe og gennemsnittet for de 3 kolber anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg/g). Desuden anføres prøvens vægttab (beregnet som vægten af det opløste stof divideret med prøvens begyndelsesvægt). De relative standardafvigelser (RSD) beregnes. Der anføres enkelttal for den samlede stofmængde (polymer + nødvendige additiver) og for polymer alene (dvs. efter subtraktion af bidraget fra disse additiver).

▼B

2.2. TEST UDFØRT MED TO FORSKELLIGE PRØVESTØRRELSER

De enkelte TOC-værdier for de vandige ekstrakter fra de to tredobbeltforsøg og gennemsnitsværdien for hvert forsøg anføres i masseenheder pr. volumen opløsning (typisk mg C/l) eller masse pr. masse polymerprøve (typisk mg C/g).

Ingen forskel mellem resultaterne for højt og lavt forhold mellem prøve og vand er tegn på, at alle ekstraherbare komponenter faktisk er ekstraheret. I så fald er direkte analyse normalt ikke påkrævet.

Vægten af hver enkelt remanens anføres, også i procent af den oprindelige prøve. Der beregnes et gennemsnit for hvert forsøg. Det procentvise indhold af opløselige og ekstraherbare stoffer i den oprindelige prøve er givet ved forskellen mellem 100 og de fundne procenttal.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1.1. **Teststof:**

— Foreliggende oplysninger om teststoffet (identitet, tilsætningsstoffer, urenheder, indhold af lavmolekylære bestanddele).

3.1.2. **Forsøgsbetingelser:**

— beskrivelse af den anvendte fremgangsmåde og forsøgsbetingelserne

— beskrivelse af analyse- og detekteringsmetoder.

3.1.3. **Resultater:**

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/l; enkeltværdier og gennemsnit for ekstraktionsforsøgene i de forskellige opløsninger, opdelt på polymer og urenheder, additiver m.v.

— resultaterne for opløselighed/ekstraherbarhed i mg/g polymer

— TOC-værdier for vandige ekstrakter, vægt af opløst stof og beregnet procentværdi, hvis målt

— pH af hver enkelt prøve

— oplysninger om blindprøver

— oplysninger om teststoffets eventuelle kemiske ustabilitet både under testproceduren og under analyseringen

— alle oplysninger, der har betydning for fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen fur Prufzwecke.

▼B

## A.21. OXIDERENDE EGENSKABER (VÆSKER)

### 1. METODE

#### 1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er måling af væskers potentiale for forøgelse af brændbare stoffers forbrændingshastighed eller -intensitet, eller deres potentiale for sammen med et brændbart stof at danne en selvantændelig blanding, når de to stoffer blandes grundigt. Metoden bygger på FN's prøve for oxiderende væsker (1) og er ækvivalent med denne. Da nærværende metode A.21 imidlertid primært er bestemt til at opfylde kravene i forordning (EF) nr. 1907/2006, kræves kun sammenligning med ét referencestof. Forventes prøvningsresultaterne anvendt til andre formål, kan sammenligning med flere referencestoffer dog være nødvendig ([1]).

Denne prøve kræves ikke udført, når det af strukturformlen uden rimelig tvivl fremgår, at stoffet er ude af stand til at reagere eksotermt med et brændbart materiale.

Før prøven udføres, vil det være nyttigt at råde over foreløbige oplysninger om stoffets eventuelle potentielle eksplosionsfarlighed.

Denne prøve finder ikke anvendelse på faste stoffer, gasser, eksplosive eller letantændelige stoffer samt organiske peroxider.

Denne prøve kræves ikke udført, når prøvningsresultater for prøvestoffet foreligger fra FN-prøven for oxiderende væsker (1).

#### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Den gennemsnitlige trykstigningstid er gennemsnitsværdien af de ved prøvningen foretagne målinger af den tid, det tager prøveblandingen at frembringe en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfære-trykket.

#### 1.3. REFERENCESTOF

Som referencestof anvendes 65 % (w/w) salpetersyre (analytisk kvalitet) ([2]).

([1]) Som f.eks. i rammerne af FN's transportregulativer.
([2]) Syren skal inden prøven titreres for at bekræfte dens styrke.

▼B

Hvis forsøgslederen forventer, at prøveresultaterne senere kan tænkes anvendt til andre formål ([1]), kan også andre referencestoffer om ønsket afprøves ([2]).

1.4. PRØVNINGSMETODENS PRINCIP

Prøvevæsken blandes med fibercellulose i masseforholdet 1:1 og overføres til en trykbeholder. Forekommer der under blanding eller overføring selvantændelse, er yderligere prøvning unødvendig.

Hvis selvantændelse ikke opstår, gennemføres hele prøven. Blandingen opvarmes i en trykbeholder, og gennemsnitstiden for en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfæretrykket beregnes. Resultatet sammenholdes med den gennemsnitlige trykstigningstid for blandingen af referencestof og cellulose i forholdet 1:1.

1.5. KVALITETSKRITERIER

I en serie bestående af 5 forsøg på samme stof må ingen resultater afvige mere end 30 % fra det aritmetiske gennemsnit. Resultater, som afviger over 30 % fra gennemsnittet, skal kasseres, blandings- og påfyldningsproceduren forbedres, og prøvningen gentages.

1.6. BESKRIVELSE AF METODEN

1.6.1. **Forberedelse**

1.6.1.1. *Brændbart stof*

Tørret fibercellulose med fiberlængde mellem 50 og 250 μm og gennemsnitsdiameter 25 μm anvendes som brændbart stof ([3]). Dette tørres til konstant vægt i et højst 25 mm tykt lag ved 105 °C i 4 timer og opbevares i exsikkator med tørremiddel, indtil det er afkølet og klart til brug. Vandindholdet i den tørrede cellulose skal være under 0,5 % på tør massebasis ([4]). Om nødvendigt forlænges tørretiden for at opnå dette ([5]). Der skal anvendes cellulose fra samme batch under hele prøven.

([1]) Som f.eks. i rammerne af FN's transportregulativer.
([2]) F.eks. anvendes i reference (1) 50 % (w/w) perchlorsyre og 40 % (w/w) natriumchlorat.
([3]) F.eks. Whatman cellulosepulver til søjlekromatografi CF 11, katalog nr. 4021 050.
([4]) Bekræftet ved (f.eks.) Karl-Fisher titrering.
([5]) Alternativt kan dette vandindhold også opnås (f.eks.) ved opvarmning til 105 °C under vakuum i 24 timer.

▼B

1.6.1.2. *Apparatur*

1.6.1.2.1. T r y k b e h o l d e r

Prøvningen skal udføres med en trykbeholder. Beholderen er en cylindrisk trykbeholder af stål med længde 89 mm og Ø udvendig 60 mm (se figur 1). To modstående flader af beholderen er bearbejdet (således at beholderens tværsnit er reduceret til 50 mm) for at lette fastholdelsen under montering af tændrør og udluftnings-prop. Beholderen, hvis boring er Ø 20 mm, er indvendigt falset i hver ende til en dybde af 19 mm og forsynet med gevind til isætning af 1" britisk standardrør (BSP)eller tilsvarende metrisk størrelse. Et trykudtag i form af et siderør er skruet ind i beholderens hvælvede overflade 35 mm fra den ene ende og i en vinkel på 90º med de bearbejdede overflader. Til montering af siderøret er udført en 12 mm dyb boring med gevind til ½" BSP (eller tilsvarende metrisk størrelse) på enden af siderøret. Om nødvendigt anvendes en pakning af inaktivt materiale for at sikre gastæt samling. Grenrøret rager 55 mm uden for trykbeholderens hus og har en boring på 6 mm. Enden af siderøret er falset og forsynet med gevind for tilslutning af tryk-transducer af membrantypen. Enhver tryk-måleanordning kan anvendes, forudsat at den ikke påvirkes af de varme gasser eller nedbrydningsprodukter og reagerer på en trykstigning på 690-2 070 kPa inden for højst 5 ms.

Den ende af trykbeholderen, som er længst fra siderøret, lukkes med et tændrør, som er monteret med to elektroder, hvoraf den ene er isoleret fra rørets hus, og den anden er jordforbundet til huset. Den modsatte ende af trykbeholderen lukkes med en sprængskive (sprængningstryk ca. 2 200 kPa), som fastholdes af en låseprop med boring Ø 20 mm. Om nødvendigt anvendes til tændrøret en pakning af inaktivt materiale for at sikre gastæt samling. Et stativ (figur 2) holder enheden i korrekt stilling under brug. Stativet består sædvanligvis af en fod af blødt stål med målene 235 mm × 184 mm × 6 mm og et 185 mm langt stykke firkantet hulprofil 70 mm × 70 mm × 4 mm.

I den ene ende af hulprofilen bortskæres en del af hver af to modstående sider, således at man opnår en struktur, som har to ben med flade sider og opadtil fortsætter i et 86 mm langt stykke intakt kasseprofil. Enderne af disse flade sider skæres af i en vinkel på 60º med det vandrette plan og svejses fast på fodpladen. I den ene side af fodstykkets øverste ende foretages en 22 mm bred og 46 mm dyb udfræsning, som giver plads til siderøret, når trykbeholderen med tændrøret først sænkes ned i kasseprofilstativet. Forneden på kasseprofilens indvendige overflade fastsvejses et stykke stål med bredde 30 mm og tykkelse 6 mm, der fungerer som afstandsstykke. Til fastholdelse af trykbeholderen anvendes to 7 mm fingerskruer, som sidder i skruehuller i den modstående flade. Nedefra støttes trykbeholderen af to 12 mm brede bånd af 6 mm tykt stål, fastsvejst på sidestykkerne, som ligger op ad kasseprofilens nederste ende.

▼B

1.6.1.2.2. Tændsystem

Tændsystemet består af en 25 cm lang Ni/Cr ledning Ø 0,6 mm med en modstand på 3,85 ohm/m. Ledningen er spiralviklet ved hjælp af en stang Ø 5 mm og fastgjort til tændrørets elektroder. Spiralen skal være udformet på en af de i figur 3 viste måder. Afstanden fra beholderens bund til tændspolens underside skal være 20 mm. Er elektroderne ikke justerbare, skal enderne af tændtråden mellem spolen og beholderens underside være isoleret med en keramisk foring. Ledningen opvarmes af en konstant strømforsyning, som kan yde mindst 10 A.

1.6.2. **Prøvens udførelse** ([1])

Apparatet, komplet med tryktransducer og opvarmningssystem, men uden sprængskive, anbringes under-støttet med tændrøret nedad. I et bægerglas blandes 2,5 g af prøvevæsken med 2,5 g tørret cellulose ved hjælp af en glasspatel ([2]). Mens blandingen finder sted, skal der være anbragt sikkerhedsskærm mellem operatøren og blandingen. Hvis der under blanding eller overføring sker selvantændelse, er yderligere prøvning unødvendig. Blandingen påfyldes trykbeholderen i små portioner ved at banke let, idet man sørger for at blandingen pakkes tæt omkring tændspolen og har god kontakt til denne. Det er vigtigt at spolen ikke forvrides under denne pakkeproces, da prøvningen ellers kan give forkerte resultater ([3]). Sprængskiven sættes på plads, og låseproppen skrues forsvarligt fast. Den fyldte beholder overføres til støttefoden med sprængskiven opad; støttefoden skal anbringes i et passende armeret stinkskab eller en brandcelle. Strømforsyningen tilsluttes tændrørets udvendige klemmer, og der påføres 10 A. Tiden fra sammenblandingen påbegyndes til strømmen sluttes, må ikke overstige 10 minutter.

Tryktransducerens signal registreres på et passende system, hvormed den opnåede trykprofil både kan vurderes og optegnes permanent (f.eks. en transientoptager koblet til en punktskriver). Blandingen opvarmes, indtil sprængskiven brydes, eller til der er gået mindst 60 s. Hvis sprængskiven ikke brydes, lader man blandingen afkøle, før apparatet forsigtigt adskilles, efter at der er truffet forholdsregler over for eventuelt overtryk. Der udføres 5 prøver med prøvestof og referencestof(fer). Den tid, det tager trykket at stige fra 690 kPa til 2 070 kPa over atmosfæretrykket, noteres. Den gennemsnitlige trykstigningstid beregnes.

I visse tilfælde kan et stof frembringe en trykstigning (for høj eller for lav), som skyldes kemiske reaktioner, der ikke karakteriserer stoffets oxiderende egenskaber. I så fald kan det være nødvendigt at gentage prøven med et inaktivt stof, f.eks. diatoméjord (kiselgur), i stedet for cellulose for at klarlægge reaktionens art.

([1]) Blandingen af oxiderende stoffer og cellulose skal behandles som eksplosionsfarlig og håndteres med tilbørlig forsigtighed.

([2]) I praksis kan dette gøres ved at man fremstiller en 1:1 blanding af prøvevæske og cellulose i større mængde end nødvendigt til prøven og overfører 5 ± 0,1 g til trykbeholderen. Blandingen skal være frisk fremstillet til hver prøvning.

([3]) Navnlig må spolens naboviklinger ikke røre hinanden.

▼B

2. **DATA**

Trykstigningstider for både prøvestof og referencestof(fer). Trykstigningstider for eventuelle prøver udført med inaktivt stof.

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

De gennemsnitlige trykstigningstider for prøvestof og referencestof(fer) beregnes.

Den gennemsnitlige trykstigningstid for eventuelle prøver udført med inaktivt stof beregnes.

I tabel 1 er givet nogle eksempler på resultater.

*Tabel 1*

**Eksempler på resultater** [a]

| Stof [b] | Gennemsnitlig trykstigningstid for en 1:1 blanding med cellulose (ms) |
|---|---|
| Ammoniumdichromat, mættet vandig opløsning | 20 800 |
| Calciumnitrat, mættet vandig opløsning | 6 700 |
| Ferrinitrat, mættet vandig opløsning | 4 133 |
| Lithiumperchlorat, mættet vandig opløsning | 1 686 |
| Magnesiumperchlorat, mættet vandig opløsning | 777 |
| Nikkelnitrat, mættet vandig opløsning | 6 250 |
| Salpetersyre, 65 % | 4 767 [c] |
| Perchlorsyre, 50 % | 121 [c] |
| Perchlorsyre, 55 % | 59 |
| Kaliumnitrat, 30 % vandig opløsning | 26 690 |
| Sølvnitrat, mættet vandig opløsning | [d] |
| Natriumchlorat, 40 % vandig opløsning | 2 555 [c] |
| Natriumnitrat, 45 % vandig opløsning | 4 133 |
| *Inaktivt stof* | |
| Vandxellulose | [d] |

[a] Vedrørende FN-transportklassifikation henvises til ref. (1).
[b] Mættede opløsninger skal fremstilles ved 20 °C.
[c] Gennemsnitsværdi af sammenlignende laboratorieprøvninger.
[d] Det maksimale tryk 2 070 kPa ikke nået.

▼B

3. **RAPPORT**

3.1. PRØVNINGSRAPPORT

Prøvningsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— det afprøvede stofs identitet, sammensætning, renhed mv.

— prøvestoffets koncentration

— metode benyttet til tørring af den anvendte cellulose

— vandindholdet i den anvendte cellulose

— måleresultaterne

— resultater af eventuelle prøvninger med inaktivt stof

— beregnede gennemsnitlige trykstigningstider

— eventuelle afvigelser fra denne metode og begrundelsen derfor

— alle supplerende oplysninger og bemærkninger, som er relevante for fortolkningen af resultaterne.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE ([1])

Prøvningsresultaterne bedømmes på grundlag af:

a) om blandingen af prøvestof og cellulose selvantænder, og

b) sammenholdelse af den gennemsnitlige tid, der går til en trykstigning fra 690 kPa til 2 070 kPa, med den tilsvarende værdi for referencestoffet (-stofferne).

Et væskeformigt stof anses for oxiderende, når:

a) en blanding af stoffet og cellulose i masseforholdet 1:1 selvantænder, eller

b) den gennemsnitlige trykstigningstid af en blanding af prøvestoffet og cellulose i masseforholdet 1:1 højst er lig den gennemsnitlige trykstigningstid for en blanding af 65 % (w/w) vandig salpetersyre og cellulose i masseforholdet 1:1.

For at undgå falske positive resultater må bedømmelsen af resultaterne om nødvendigt også inddrage resultaterne af prøvning af stoffet med inaktivt materiale.

([1]) Vedrørende fortolkning af resultater med brug af flere referencestoffer i henhold til FN's transportregulativer henvises til reference (1).

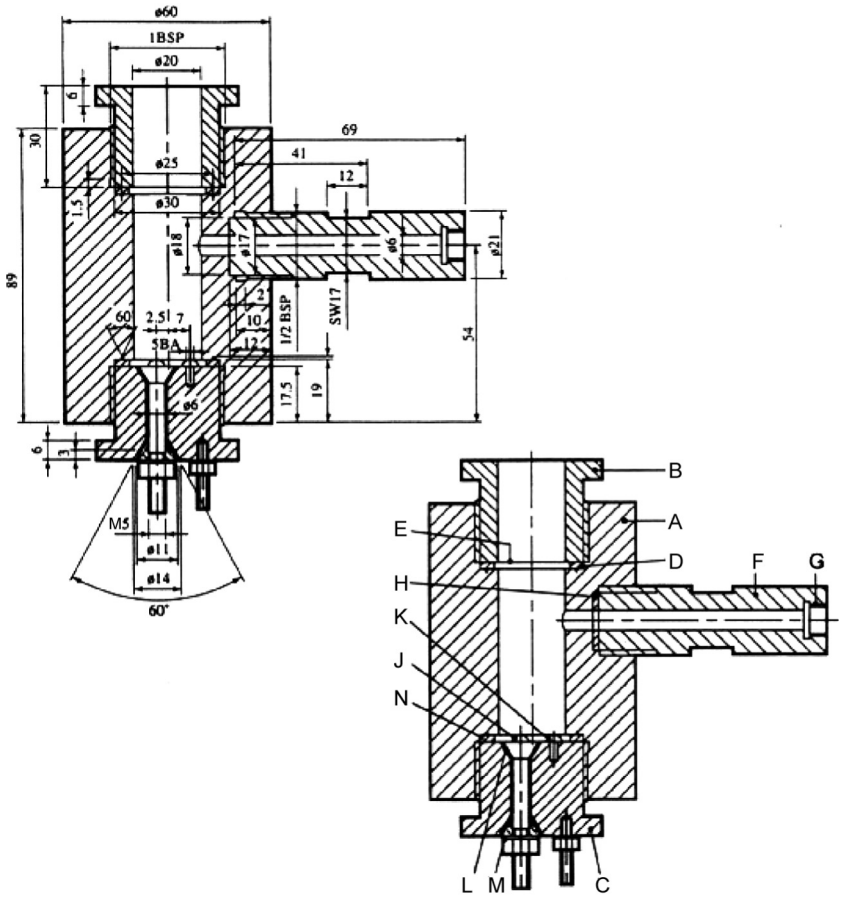
▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

*Fig. 1*

**Trykbeholder**




(A) Trykbeholderlegeme

(B) Låseprop for sprængskive

(C) Tændrør

(D) Blød blyskive

(E) Sprængskive

(F) Siderør

(G) Tryktransducerhoved

(H) Skive

(J) Isoleret elektrode

(K) Jordforbundet elektrode

(L) Isolering

(M) Stålkonus

(N) Skiveforvridende rille

▼B

*Fig. 2*

**Stativ**

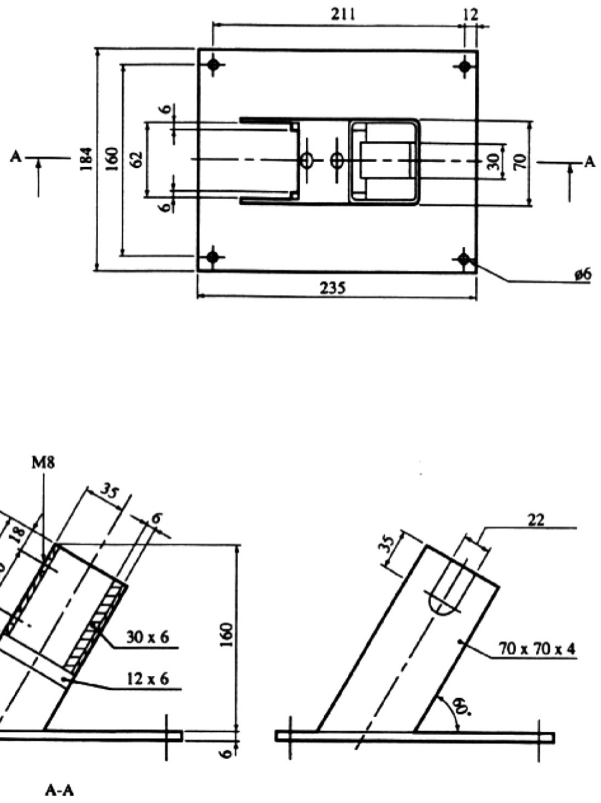
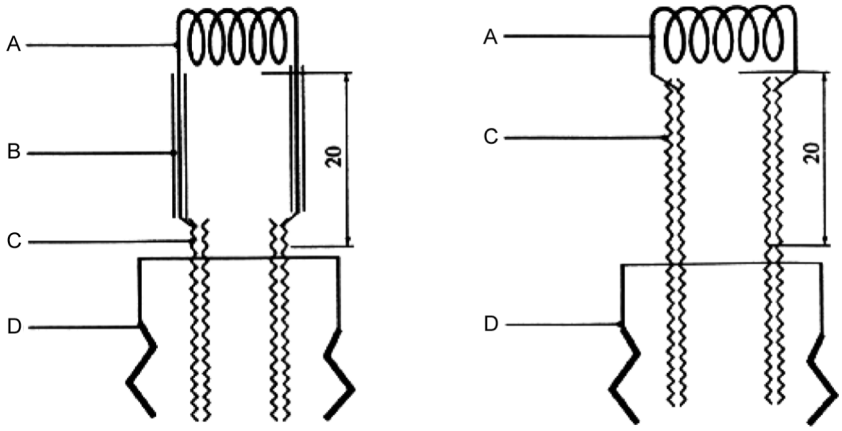



*Fig. 3*

**Tændsystem**

(A) Tændspole (B) Isolering (C) Elektroder (D) Tændrør




Note: Begge disse opstillinger kan bruges.

▼M1

A.22. **FIBRES LÆNGDEVÆGTEDE GEOMETRISKE MIDDELDIAMETER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Denne metode beskriver en procedure til måling af den længdevægtede geometriske middeldiameter (Length Weighted Geometric Mean Diameter — LWGMD) af syntetiske mineralfibre i løs vægt (Man Made Mineral Fibres — MMMF). Idet LWGMD af populationen med 95 % sandsynlighed vil ligge mellem 95 % konfidensgrænserne (LWGMD ± to standardfejl) af prøven, vil den fremkomne værdi (testværdien) være den laveste 95 % konfidensgrænse af prøven (dvs. LWGMD — 2 standardfejl). Metoden er baseret på et opdateret udkast (juni 1994) til HSE's industriprocedure, som blev fastlagt på et møde mellem ECFIA og HSE i Chester den 26. september 1993, og som er udviklet for og med udgangspunkt i et yderligere forsøg blandt forskellige laboratorier (1, 2). Denne målemetode kan anvendes til at bestemme fiberdiameteren af bulk-materialer eller produkter, der indeholder MMMF'er, herunder ildfaste keramiske fibre (RCF), Man-Made Vitreous Fibres (MMVF — fællesbetegnelse for syntetiske fibre indeholdende siliciumdioxid og en række andre metaloxider) og endelig krystallinske og polykrystallinske fibre.

Længdevægtning er en metode, der skal kompensere for den virkning af diameterfordelingen, der skyldes brud på lange fibre, når materialer udsættes for prøveudtagning eller håndtering. Der anvendes geometrisk statistik (geometrisk middelværdi) til at måle størrelsesfordelingen af MMMF-diametre, idet disse diametre almindeligvis har størrelsesfordelinger, der tilnærmer sig log-normal.

Måling af både længde og diameter er ensformigt og tidskrævende, men hvis man kun måler de fibre, der rører en uendelig tynd linje på et SEM-synsfelt, vil sandsynligheden for at vælge en given fiber være proportional med dens længde. Da der her tages hensyn til længden i beregninger om længdevægtning, er der kun behov for diameteren, hvorefter LWGMD-2SE kan beregnes som beskrevet.

1.2. DEFINITIONER

**Partikel**: et objekt med et længde-breddeforhold på mindre end 3:1.

**Fiber**: et objekt med et længde-breddeforhold (formatforhold) på mindst 3:1.

1.3. ANVENDELSESOMRÅDE OG BEGRÆNSNINGER

Metoden er udviklet med fokus på diameterfordelinger med mediandiametre fra 0,5 μm til 6 μm. Større diametre kan måles ved hjælp af mindre SEM-forstørrelser, men metoden bliver gradvist mere begrænset med finere fiberfordelinger, og derfor anbefales en TEM-måling (transmission electron microscope), hvis mediandiameteren er under 0,5 μm.

▼M1

1.4. Principper for testmetoden

Der udtages en række repræsentative kerneprøver fra fibertæppet eller fra de løse bulkfibre. Bulkfibrene afkortes i en knusningsproces, hvorefter der spredes en repræsentativ delprøve i vand. Der udtages måleprøver, der filtreres gennem et polykarbonatfilter med en porestørrelse på 0,2 μm, hvorefter de forberedes til undersøgelse i scanning-elektronmikroskop (SEM-teknologi). Fiberdiametrene måles ved en skærmforstørrelse på x 10 000 eller højere ([1]) ved hjælp af en linjeskæringspunktmetode for at give et objektivt estimat af mediandiameteren. Det laveste 95 % konfidensinterval (baseret på en ensidet test) beregnes for at give et estimat af den laveste værdi af materialets geometriske middelfiberdiameter.

1.5. Beskrivelse af testmetoden

1.5.1. **Sikkerhedsforanstaltninger**

Medarbejdernes eksponering for luftbårne fibre bør minimeres, og der bør anvendes aftræksskab eller handskekasse ved håndtering af tørre fibre. Der bør gennemføres periodisk overvågning af medarbejdernes eksponering med henblik på at vurdere effektiviteten af de anvendte kontrolmetoder. Ved arbejde med MMMF'er skal der bæres engangshandsker for at reducere hudirritation og for at forebygge krydskontaminering.

1.5.2. **Apparatur og udstyr**

— presse og matricer (der kan producere 10 MPa)

— polykarbonat-kapillærfilter med en porestørrelse på 0,2 μm (25 mm diameter)

— membranfilter i ester-cellulose med en porestørrelse på 5 μm til brug som backing-filter

— apparatur til glasfiltrering (eller engangsfiltreringssystemer), der passer til filtre med en diameter på 25 mm (f.eks. Millipore glasmikroanalysesæt, type nr. XX10 025 00)

— frisk destilleret vand, der er filtreret gennem et filter med en porestørrelse på 0,2 μm for at fjerne mikroorganismer

— sputter-coater med guld eller guld/palladium target

— scanning elektronmikroskop med en opløsning ned til 10 nm og med forstørrelse x 10 000

— diverse: spatler, skalpelblade type 24, pincetter, SEM-rør, carbonlim eller carbon-klæbebånd, silver-dag

— ultralydsonde eller bordmonteret ultralydsbad

— kerneprøvebor eller propbor til udtagelse af kerneprøver af MMMF-tæppe.

([1]) Denne forstørrelsesværdi gælder for 3 μm fibre. For 6 μm fibre vil en forstørrelse på × 5 000 være mere passende.

▼M1

1.5.3. **Testprocedure**

1.5.3.1. *Prøveudtagning*

Til tæpper og måtter anvendes der et 25 mm kerneprøvebor eller propbor til udtagning af stikprøver af tværsnittet. De bør være jævnt fordelt over hele bredden af et kort stykke tæppe eller udtages fra tilfældige områder, hvis der er lange tæppelængder til rådighed. Man kan anvende det samme udstyr til udtagning af tilfældige stikprøver fra løse fibre. Hvis det er muligt, skal der udtages seks stikprøver for at afspejle lokale variationer i bulkmaterialet.

De seks kerneprøver knuses med et pressestempel på 50 mm diameter ved 10 MPa. Materialet blandes med spatel og presses igen ved 10 MPa. Endelig fjernes materialet fra pressen og opbevares i en lukket glasflaske.

1.5.3.2. *Behandling af stikprøver*

Hvis det er nødvendigt, kan det organiske bindemiddel fjernes ved at anbringe fibrene i en ovn ved 450 °C i ca. en time.

Ved hjælp af Cone-and-Quarter-teknikken opdeles stikprøven (dette skal udføres i et støvskab).

Med en spatel tilsættes en lille mængde (< 0,5 g) af stikprøven til 100 ml frisk destilleret vand, der er filtreret gennem et 0,2 μm membranfilter (alternative former for ultra-rent vand kan også bruges, hvis de har vist sig tilfredsstillende). Prøven dispergeres omhyggeligt ved hjælp af en ultralyd-sonde med en effekt på 100 W, der er indstillet, så der opstår kavitation. (Hvis der ikke kan tilvejebringes en sonde, kan følgende metode anvendes: Ryst og vend i 30 sekunder; derefter ultralydsbehandling i bordmonteret ultralydsbad i fem minutter, og endelig skal der igen rystes og vendes i 30 sekunder).

Umiddelbart efter dispersion af fibrene udtages der et antal måleprøver (f.eks. tre måleprøver på 3, 6 og 10 ml) med en pipette med stor åbning (kapacitet: 2-5 ml).

Hver delprøve vacuumfiltreres gennem et 0,2 μm polykarbonatfilter med et MEC backing-filter med en porestørrelse på 5 μm og med en 25 mm glasfiltertragt med cylindrisk beholder. Der hældes ca. 5 ml filtreret destilleret vand i tragten, og delprøven tilføres derefter langsomt vandet med pipette, idet pipettespidsen holdes under væskeoverfladen. Pipette og beholder skal gennemskylles omhyggeligt efter afpipetteringen, idet tynde fibre har en tendens til at samles på overfladen.

Filtret fjernes forsigtigt og tages af fra backing-filtret, inden det sættes til tørre i en beholder.

▼M1

Med en vippende bevægelse udskæres et kvart eller et halvt filterudsnit af det filtrerede bundfald ved hjælp af et skalpelblad type 24. Udskæringen anbringes forsigtigt på en SEM-stub ved hjælp af en klæbende carbon-tab eller carbon-lim. Der skal påsættes Silver-dag mindst tre steder for at optimere den elektriske kontakt på filterkanterne og på stubben. Når den påførte lim/silver-dag er tør, sputtercoates ca. 50 nm guld eller guld/palladium på overfladen af bundfaldet.

1.5.3.3. *Kalibrering og betjening af SEM*

1.5.3.3.1. Kalibrering

SEM-kalibrering bør kontrolleres mindst en gang om ugen (og helst hver dag) ved hjælp af et Certified Calibration Grid. Kalibreringen bør kontrolleres i forhold til en certificeret standard. Hvis den målte værdi (SEM) ikke ligger inden for ± 2 % af den certificerede værdi, skal SEM-kalibreringen gentages eller justeres.

SEM skal kunne arbejde med mindst en synlig minimumdiameter på 0,2 μm ved hjælp af en reel stikprøvematrix ved en forstørrelse på x 2 000.

1.5.3.3.2. Betjening

SEM skal arbejde ved 10 000 forstørrelse ([1]) og indstilles til at give en god opløsning med et acceptabelt billede ved langsomme scanrates, f.eks. 5 sekunder pr. frame. Selv om betjeningen af forskellige SEM'er kan variere noget, så gælder det generelt, at man for at opnå den bedste synlighed og opløsning ved materialer med relativt lav atomvægt bør anvende stigende spændinger på 5-10 keV og indstille apparaturet til lille punktstørrelse og kort arbejdsafstand. Da man arbejder lineært gennem materialet, skal man vælge en 0º hældning for at minimere genfokusering eller, hvis SEM'en er udstyret med et eucentrisk trin, skal denne arbejdsafstand anvendes. Der kan vælges en lavere forstørrelse, hvis materialet ikke indeholder små (diameter) fibre, og fiberdiameteren er stor (> 5 μm).

1.5.3.4. *Størrelsesvurdering*

1.5.3.4.1. Undersøgelse ved lille forstørrelse til vurdering af stikprøven

Først skal stikprøven undersøges ved lille forstørrelse for at afdække eventuel sammenklumpning af store fibre og for at vurdere fibertætheden. Hvis der konstateres for stor sammenklumpning, anbefales det, at der forberedes en ny prøve.

Af hensyn til den statistiske nøjagtighed er det nødvendigt at måle et minimumsantal fibre. Ligeledes er høj fibertæthed at foretrække, da undersøgelse af tomme felter er tidskrævende og uden værdi for analysen. Hvis filtret derimod er overbelastet, er det svært at måle alle målbare fibre, og desuden risikerer man ikke at få målt de små fibre, da de let ligger skjult af de større fibre.

([1]) For 3 μm fibres vedkommende, se forrige note.

▼**M1**

En systematisk fejl i retning af en for høj værdi af LWGMD kan optræde som følge af fibertætheder på over 150 fibre pr. millimeter lineært snit. På den anden side vil lave fiberkoncentrationer forøge analysetiden, og derfor kan det ofte bedre betale sig at forberede en prøve med en tæthed, der ligger nær optimal tæthed, end at blive ved med at tælle på filtre med lave koncentrationer. Den optimale fibertæthed vil give et gennemsnit på ca. et eller to tælbare fibre pr. felt ved 5 000 forstørrelse. Den optimale tæthed vil imidlertid afhænge af størrelsen (diameteren) af fibrene. Derfor skal analysemedarbejderen støtte sig til en ekspertvurdering for at kunne afgøre, om fibertætheden er nær ved det optimale eller ej.

1.5.3.4.2. Længdevægtning af fiberdiametre

Det er kun de fibre, der rører (eller ligger på tværs af) en (uendelig) tynd linje afsat på SEM'ens skærm, der tælles. Derfor er der afsat en horisontal (eller vertikal) linje tværs gennem skærmens centrum.

Alternativt er der afsat et enkelt punkt i skærmens centrum, hvorefter der foretages en kontinuerlig scanning i en retning på tværs af filtret. Enhver fiber, der har et formatforhold større end 3:1, og som berører eller går gennem dette punkt, bliver underkastet måling af diameter, hvorefter resultatet registreres.

1.5.3.4.3. Størrelsesvurdering af fibre

Det anbefales, at der måles mindst 300 fibre. Hver fiber måles kun én gang ved skæringspunktet med den linje eller det punkt, der er afsat på billedet (eller tæt ved skæringspunktet, hvis fiberkanterne er skjult). Hvis man støder på fibre med uensartede tværsnit, skal man foretage en måling, der repræsenterer fiberens gennemsnitsdiameter. Man skal være meget omhyggelig med at udpege kanten og måle den korteste afstand mellem fiberens kanter. Størrelsesvurderingen kan ske online eller offline på lagrede billeder eller fotos. Det anbefales at bruge systemer til halvautomatisk billedmåling, der henter data direkte ind i et regneark, da de sparer tid og udelukker afskriftsfejl. Endelig automatiserer de beregningerne.

Enderne af lange fibre skal undersøges ved lille forstørrelse for at sikre, at de ikke krummer tilbage i målefeltet og derved måles flere gange.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Fiberdiametre følger almindeligvis ikke en normalfordeling. Hvis man gennemfører en log-transformation, er det dog muligt at opnå en fordeling, der ligger nær ved normalfordelingen.

Den aritmetiske middelværdi (mean lnD) og standardafvigelsen ($SD_{lnD}$) af den naturlige logaritme (lnD) til n fiberdiametre (D) beregnes.

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \quad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardafvigelsen divideres med kvadratroden af antallet af målinger (n) for at nå frem til standardfejlen ($SE_{lnD}$).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

To gange standardfejlen trækkes fra middelværdien, og eksponentialfunktionen af denne værdi (middelværdi minus to standardfejl) beregnes for at få den geometriske middelværdi minus to geometriske standardfejl.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

— værdien af LWGMD-2SE

— enhver afvigelse og især de afvigelser, der vil kunne påvirke præcisionen eller nøjagtigheden af resultaterne med tilhørende behørigt begrundede tilfælde.

4. **REFERENCER**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Februar 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/-MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

## A.23. FORDELINGSKOEFFICIENT (1-OCTANOL/VAND): SLOW-STIRRING-METODEN

INDLEDNING

1. Denne metode svarer til OECD Test Guideline (TG) 123 (2006). 1-Octanol/vand-fordelingskoefficienten ($P_{OW}$) er for $P_{OW}$-værdier svarende til log $P_{OW}$ på indtil 8,2 blevet bestemt nøjagtigt med slow-stirring-metoden (1). Metoden er derfor velegnet til direkte eksperimentel bestemmelse af $P_{OW}$ for stærkt hydrofobe stoffer.

2. Andre metoder, der beskriver fremgangsmåden til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten ($P_{OW}$), er »shake-flask«-metoden (2) og bestemmelse af $P_{OW}$ ud fra retentionsmønsteret ved omvendt-fase HPLC (3). »Shake-flask«-metoden er tilbøjelig til at give artefakter på grund af overførsel af mikrodråber af octanol til den vandige fase. For stigende $P_{OW}$ vil tilstedeværelse af sådanne dråber i den vandige fase medføre stadig større overvurdering af teststoffets koncentration i vandet. Metoden kan derfor kun anvendes på stoffer med log $P_{OW} < 4$. I den anden metode anvendes pålidelige, direkte bestemte $P_{OW}$-værdier til kalibrering af sammenhængen mellem HPLC-retentionsmønsteret og de målte $P_{OW}$-værdier. Der er desuden udarbejdet et udkast til en OECD-guideline til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienterne for ioniserbare stoffer (4), men den bør ikke anvendes.

3. Denne metode er udviklet i Nederlandene. Præcisionen af de beskrevne metoder er valideret og optimeret i en ringtest med deltagelse af 15 laboratorier (5).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

**Signifikans og anvendelse**

4. For inerte organiske stoffer er der konstateret en meget signifikant sammenhæng mellem stoffernes 1-octanol/vand-fordelingskoefficient ($P_{OW}$) og bioakkumuleringen i fisk. Desuden er $P_{OW}$ påvist at være korreleret såvel med toksicitet over for fisk som med deres sorption af kemikalier til faste stoffer, som f.eks. jord og sedimenter. En omfattende gennemgang af disse sammenhænge er givet i reference (6).

5. En lang række forskellige sammenhænge er fastlagt mellem 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten og andre miljøtoksikologisk og miljøkemisk relevante stofegenskaber. I konsekvens heraf er 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten blevet en nøgleparameter såvel ved vurdering af kemikaliers miljøfarlighed som ved forudsigelse af deres skæbne i miljøet.

**Anvendelsesområde**

6. Slow-stirring-metoden antages at nedsætte dannelsen af mikrodråber af 1-octanol i vandfasen. Derved undgås den overvurdering af teststofkoncentrationen i den vandige fase, der skyldes teststofmolekyler knyttet til sådanne dråber. Slow-stirring-metoden er derfor særlig velegnet til bestemmelse af $P_{OW}$ for stoffer med en forventet log $P_{OW}$-værdi på 5 eller derover, hvor shake-flask-metoden (2) er tilbøjelig til at give fejlagtige resultater.

▼M4

DEFINITIONER OG ENHEDER

7. Et stofs fordelingskoefficient mellem vand og et lipofilt opløsningsmiddel (1-octanol) karakteriserer kemikaliets ligevægtsfordeling mellem de to faser. Fordelingskoefficienten mellem vand og 1-octanol ($P_{OW}$) defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne af teststoffet i 1-octanol mættet med vand ($C_O$) og i vand mættet med 1-octanol ($C_W$).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Den er et koncentrationsforhold og er derfor dimensionsløs. Den angives oftest ved sin titalslogaritme (log $P_{OW}$). $P_{OW}$ er temperaturafhængig, og rapporterede data skal derfor omfatte måletemperaturen.

METODENS PRINCIP

8. Til bestemmelse af fordelingskoefficienten bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden ved konstant temperatur. Derefter bestemmes teststoffets koncentration i de to faser.

9. Den her foreslåede slow-stirring-metode mindsker de eksperimentelle vanskeligheder, der er forbundet med dannelse af mikrodråber, når shake-flask-metoden benyttes. I slow-stirring-metoden bliver vand, 1-octanol og teststof bragt i ligevægt med hinanden i en termostatstyret reaktionsbeholder med omrører. Transporten af stoffer mellem faserne fremskyndes ved omrøring. Ved omrøringen opstår der en vis turbulens, der øger stoftransporten mellem 1-octanol og vand, uden at der dannes mikrodråber (1).

TESTMETODENS ANVENDELIGHED

10. Da tilstedeværelse af andre stoffer end teststoffet kan tænkes at have indflydelse på teststoffets aktivitetskoefficient, skal teststoffet afprøves i ren form. Den reneste gængse kvalitet af teststoffet til bestemmelsen af fordelingen 1-octanol/vand skal anvendes.

11. Denne metode finder anvendelse på rene stoffer, der ikke dissocierer eller associerer, og som ikke udviser nævneværdig overfladeaktivitet. Den kan anvendes til bestemmelse af 1-octanol/vand-fordelingskoefficienten for sådanne stoffer og for blandinger. Når metoden anvendes på blandinger, afhænger de målte fordelingsforhold 1-octanol/vand dels af den testede blandings kemiske sammensætning, dels af sammensætningen af den elektrolytblanding, der anvendes som vandig fase. Forudsat der træffes supplerende foranstaltninger, kan metoden også anvendes på stoffer, der dissocierer eller associerer (afsnit 12).

12. Som følge af de mange forskellige ligevægte, der optræder ved fordelingen mellem 1-octanol/vand af dissocierende forbindelser som organiske syrer og phenoler, organiske baser og metalorganiske forbindelser, er fordelingsforholdet i 1-octanol/vand en betinget konstant, der afhænger stærkt af elektrolytsammensætningen (7) (8). Bestemmelse af fordelingsforholdet i 1-octanol/vand kræver derfor styring og rapportering af pH og elektrolytsammensætning i testen. Vurdering af sådanne fordelingsforhold kræver ekspertviden. Ud fra størrelsen af dissociationskonstanterne må der vælges passende pH-værdier, således at der bestemmes et fordelingsforhold for hver ioniseringstilstand. Til testning af metalorganiske forbindelser skal de anvendte buffere være ikke-kompleksdannende (8). På grundlag af kendskabet til vandige opløsningers kemi (kompleksdannelseskonstanter, dissociationskonstanter) må testbetingelserne vælges, så at det er muligt at fastlægge, i hvilke former teststoffet optræder i den vandige fase. Ionstyrken skal holdes identisk i alle test ved anvendelse af en baggrundselektrolyt.

▼M4

13. Teststoffer med lav vandopløselighed eller høj $P_{OW}$ kan volde vanskeligheder, fordi koncentrationen i vandfasen bliver meget lav og derfor vanskeligt kan bestemmes nøjagtigt. Det beskrives i metoden, hvordan dette problem gribes an.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

14. Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet eller bedre. Det anbefales, at der enten anvendes umærket teststof med kendt kemisk sammensætning og helst mindst 99 % renhed eller radioaktivt mærket teststof med kendt kemisk sammensætning og radiokemisk renhed. Anvendes der radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald. Hvis der anvendes radioaktivt mærket teststof, skal analysemetoden være specifik for det pågældende kemiske stof for at sikre, at den målte radioaktivitet hænger direkte sammen med teststoffet.

15. Log $P_{OW}$ kan enten bestemmes ved hjælp af gængs software til bestemmelse af log $P_{OW}$ eller ud fra forholdet mellem opløselighederne i de to opløsningsmidler.

16. Før man udfører en test til bestemmelse af $P_{OW}$ med slow-stirring-metoden, skal der foreligge følgende oplysninger om teststoffet:

a) strukturformel

b) egnede analysemetoder til bestemmelse af stoffets koncentration i vand og 1-octanol

c) dissociationskonstant(er) for ioniserbare stoffer (OECD Guideline 112 (9))

d) vandopløselighed (10)

e) abiotisk hydrolyse (11)

f) umiddelbar bionedbrydelighed (12)

g) damptryk (13).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Udstyr og apparatur**

17. Der kræves sædvanligt laboratorieudstyr, herunder specielt følgende:

— magnetomrørere og teflonbelagte magneter til omrøring af vandfasen

— egnet analyseudstyr til bestemmelse af teststoffets koncentration i det forventede koncentrationsområde

— omrørerbeholder med bundhane. Afhængigt af den skønnede $P_{OW}$-værdi og detektionsgrænsen (LOD) for teststoffet må det overvejes at anvende en reaktionsbeholder med kapacitet på mere end én liter, men med samme geometri, for at der kan udtages et tilstrækkeligt volumen vand til kemisk ekstraktion og analyse. Derved bliver koncentrationerne i det vandige ekstrakt højere, og den analytiske bestemmelse dermed mere pålidelig. En tabel med anslåede værdier af det minimale nødvendige volumen, detektionsgrænsen for teststoffet, dets anslåede log $P_{OW}$ og dets vandopløselighed er givet i tillæg 1. Tabellen er baseret på sammenhængen mellem log $P_{OW}$ og forholdet mellem opløseligheden i octanol og vand som angivet af Pinsuwan et al. (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

hvor:

$SR = S_{oct}/S_w$ (i molaritet)

og på den af Lyman (15) angivne relation til forudsigelse af vandopløselighed. En vandopløselighed, der er beregnet med ligningen i tillæg 1, må anses for et foreløbigt skøn. Det bemærkes, at det står brugeren frit at foretage en beregning af vandopløseligheden ved hjælp af enhver relation, der måtte anses for bedre til at beskrive sammenhængen mellem hydrofobicitet og opløselighed. For faste stoffer anbefales det f.eks. at lade smeltepunktet indgå i skønnet over opløseligheden. Hvis en modificeret ligning anvendes, må det efterprøves, at ligningen til beregning af opløseligheden i octanol stadig kan anvendes. Tillæg 2 indeholder en skematisk tegning af en omrørerbeholder med glaskappe og et volumen på ca. en liter. Beholderen i tillæg 2 har vist sig at have hensigtsmæssige proportioner, som bør bibeholdes, hvis der anvendes udstyr af anden størrelse

— en anordning til at fastholde en konstant temperatur er ubetinget nødvendig under slow-stirring-testen.

18. Beholderen skal være udført i inert materiale, så der kan ses bort fra adsorption til beholderens overflade.

**Fremstilling af testopløsningerne**

19. Til bestemmelsen af $P_{OW}$ skal der anvendes 1-octanol af reneste handelskvalitet (over 99 %). Rensning af den anvendte 1-octanol ved ekstraktion med syre, base og vand og efterfølgende tørring anbefales. Derudover kan 1-octanol renses ved destillation. Til fremstilling af standardopløsningerne af teststofferne skal der bruges renset 1-octanol. Vandet, der benyttes til bestemmelse af $P_{OW}$, skal enten være destilleret i glas eller kvarts, hidrøre fra et rensningssystem eller være af HPLC-kvalitet. Destilleret vand skal filtreres gennem et 0,22 μm filter, og der skal indgå blindprøver for at kontrollere, at der ikke er urenheder, der kan gribe forstyrrende ind i bestemmelsen af teststoffet i de koncentrerede ekstrakter. Hvis der anvendes et glasfiberfilter, skal det renses ved opvarmning til 400 °C i mindst tre timer.

20. Inden testen mættes de to faser gensidigt ved ækvilibrering i en tilstrækkelig stor beholder. Dette opnås ved langsom omrøring (slow-stirring) af tofasesystemet i to døgn.

21. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Fordelingskoefficienten 1-octanol/vand bestemmes i fortyndede opløsninger i 1-octanol og vand. Koncentrationen af teststoffet bør derfor ikke være over 70 % af opløseligheden, og ikke over 0,1 M i nogen af faserne (1). De anvendte 1-octanol-opløsninger skal være fri for opslæmmede faste partikler af teststof.

22. Der udtages en passende mængde teststof, som opløses i 1-octanol (mættet med vand). Hvis den anslåede værdi af $P_{OW}$ er over fem, skal det sikres, at de i testen anvendte 1-octanol-opløsninger er fri for opslæmmede partikler af teststoffet. Til dette formål benyttes følgende fremgangsmåde til kemikalier med en anslået log $P_{OW}$-værdi > 5:

— Teststoffet opløses i 1-octanol (mættet med vand).

▼M4

— Opløsningen henstår så længe, at opslæmmede partikler når at bundfælde sig. Mens bundfældelsen står på, overvåges koncentrationen af teststoffet.

— Når de målte koncentrationer i 1-octanol-opløsningen er blevet stabile, fortyndes stamopløsningen med et passende volumen 1-octanol.

— Koncentrationen af den fortyndede stamopløsning måles. Hvis den målte koncentration er i overensstemmelse med den foretagne fortynding, kan den fortyndede stamopløsning anvendes til slow-stirring-testen.

**Ekstraktion og analyse af prøver**

23. Til assay af teststoffet skal der anvendes en valideret analysemetode. De for analysen ansvarlige skal dokumentere, at koncentrationerne både i den vandmættede 1-octanol-fase og i den 1-octanol-mættede vandfase er over kvantificeringsgrænsen for den anvendte analysemetode gennem hele testen. Når det er nødvendigt at bruge ekstraktion, skal genfindingen af teststoffet ved analysen af vandfasen og 1-octanol-fasen bestemmes inden testen. Analysesignalet skal korrigeres for blindværdi, og det skal sikres, at der ikke kan overføres analysand fra én prøve til en anden.

24. På grund af de ret lave koncentrationer i vandfasen af et hydrofobt teststof vil det antagelig være nødvendigt at ekstrahere vandfasen med et organisk opløsningsmiddel og forkoncentrere ekstrakten inden analyse. Af samme grund er det nødvendigt at reducere et eventuelt indhold i blindprøverne. Det kræver, at der anvendes opløsningsmidler af høj renhed, fortrinsvis opløsningsmidler til reststofanalyse. Derudover vil omhyggelig rensning af det anvendte glasapparatur(f.eks. vask med opløsningsmiddel eller opvarmning til høj temperatur) medvirke til at undgå krydskontaminering.

25. Et skøn over log $P_{OW}$ kan fås af et beregningsprogram eller ved en ekspertvurdering. Hvis værdien er over seks, skal blindkorrektioner og overførsel af analysand nøje overvåges. Hvis den anslåede værdi af log $P_{OW}$ er over seks, er det desuden obligatorisk at bruge en surrogatstandard til korrektion for genfinding, for at der kan opnås en høj forkoncentrationsfaktor. Til tilnærmet beregning af en log $P_{OW}$-værdi findes der på markedet forskellige softwareprogrammer ([1]), f.eks. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) og ACD log P (19). Metoderne til tilnærmet beregning er beskrevet i referencerne (20-22).

26. Kvantificeringsgrænserne (LOQ) for bestemmelse af teststoffet i 1-octanol og vand fastlægges med anerkendte metoder. Som tommelfingerregel kan metodens kvantificeringsgrænse sættes til den koncentration i vand eller 1-octanol, der frembringer et signal/støjforhold på 10. Der skal vælges en passende metode til ekstraktion og forkoncentrering, og genfindingsværdierne ved analysen skal ligeledes angives. Forkoncentreringsfaktoren skal vælges, så der opnås et signal af den nødvendige størrelse ved den analytiske bestemmelse.

([1]) Denne oplysning er kun til orientering for brugerne. Andre tilsvarende softwareprogrammer kan anvendes, hvis det kan dokumenteres, at de giver de samme resultater.

▼M4

27. På grundlag af analysemetodens parametre og de forventede koncentrationer bestemmes den omtrentlige prøvemængde, der er nødvendig for at få en nøjagtig bestemmelse af teststofkoncentrationen. Det bør undgås at tage vandprøver, der er for små til at give et tilstrækkeligt analysesignal. Ligeledes bør det undgås at tage vandprøver, der er alt for store, da der i så fald kan være for lidt vand tilbage til det nødvendige mindste antal analyser (n = 5). I tillæg 1 er angivet det minimale prøvevolumen som funktion af beholdervolumen, detektionsgrænse for teststoffet og opløselighed af teststoffet.

28. Kvantificering af teststoffet foretages ved sammenholdelse med kalibreringskurverne for den pågældende forbindelse. Koncentrationerne i de analyserede prøver skal ligge i intervallet mellem den højeste og den laveste koncentration af standard.

29. For teststoffer med en anslået log $P_{OW}$-værdi højere end seks skal der før ekstraktion tilsættes en surrogatstandard til vandet for at registrere tab under ekstraktion og forkoncentrering af vandprøverne. For at der kan korrigeres nøjagtigt for genfindingsgraden, skal surrogaternes egenskaber nøje svare til teststoffets eller være identiske dermed. Til det formål bør der fortrinsvis anvendes (stabile) isotopmærkede analoger af de undersøgte stoffer (f.eks. deuterium- eller $^{13}C$-mærkede). Hvis det ikke er muligt at anvende stabile, isotopmærkede analoger, f.eks. $^{13}C$ eller $^{2}H$, skal det ud fra pålidelige litteraturdata godtgøres, at surrogaternes fysisk-kemiske egenskaber ligger meget tæt på teststoffets. Under væske-væske ekstraktion af vandfasen kan der dannes emulsioner. Emulsionsdannelsen kan begrænses ved tilsætning af salt og ved at lade emulsionen sætte sig natten over. De anvendte metoder til ekstraktion og forkoncentrering af prøverne skal beskrives.

30. Prøverne af 1-octanolfasen kan om nødvendigt fortyndes med et passende opløsningsmiddel inden analyse. Desuden anbefales brug af surrogatstandarder til korrektion for genfindingsgraden for stoffer, som har udvist stor variation ved genfindingsforsøgene (relativ standardafvigelse > 10 %).

31. Analysemetoden skal beskrives i detaljer. Herunder angives ekstraktionsmetode, forkoncentrerings- og fortyndingsfaktor, instrumentparametre, kalibreringsrutine, kalibreringsområde, analytisk genfinding af teststoffet i vand, tilsætning af surrogatstandarder til korrektion for genfindingsgrad, blindværdier, detektionsgrænser og kvantificeringsgrænser.

**Testens udførelse**

*Optimale volumenforhold 1-octanol/vand*

32. Ved valg af volumenet af vand og volumenet af 1-octanol skal følgende forhold tages i betragtning: kvantificeringsgrænsen i 1-octanol og vand, de forkoncentreringsfaktorer, der anvendes på vandprøverne, de udtagne prøvevolumener af 1-octanol og vand samt de forventede koncentrationer. Af hensyn til forsøgets udførelse skal volumenet af 1-octanol i slow-stirring-systemet vælges, så 1-octanol-laget er tilstrækkelig tykt (> 0,5 cm) til, at der kan tages prøver af 1-octanol-fasen uden at forstyrre denne.

33. Til bestemmelse af forbindelser med log $P_{OW}$ på 4,5 og derover anvendes typisk et forhold mellem faserne på 20-50 ml 1-octanol og 950-980 ml vand i en beholder på én liter.

▼M4

*Testbetingelser*

34. Under testen skal reaktionsbeholderen være termostateret med en temperaturvariation på under 1 °C. Assayet skal udføres ved 25 °C.

35. Testsystemet skal være beskyttet mod dagslys, enten ved brug af mørkekammer eller ved indpakning af reaktionsbeholderen i alufolie.

36. Testen skal (så vidt muligt) udføres i støvfrit miljø.

37. Systemet 1-octanol-vand omrøres, til det har nået ligevægt. Der foretages et indledende pilotforsøg, hvor ækvilibreringsperioden bestemmes ved slow-stirring metoden med regelmæssig prøveudtagning af vand og 1-octanol. Der skal gå mindst fem timer mellem prøveudtagningerne.

38. Hver $P_{OW}$-bestemmelse skal ske ved hjælp af mindst tre uafhængige slow-stirring-test.

*Bestemmelse af ækvilibreringstiden*

39. Ligevægt antages at være nået, når afbildning af koncentrationsforholdet i 1-octanol/vand mod tiden i fire tidspunkter resulterer i en regressionslinje med en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra nul ved et p-niveau på 0,05. Der skal ækvilibreres i mindst ét døgn, før prøvetagningen påbegyndes. For stoffer med en anslået log $P_{OW}$-værdi på mindre end fem kan prøveudtagning som tommelfingerregel finde sted på dag to og tre. For mere hydrofobe forbindelser kan det være nødvendigt med længere ækvilibreringstid. For en forbindelse med en log $P_{OW}$ på 8,23 (decachlorbiphenyl) var 144 timer tilstrækkeligt til ækvilibrering. Opnåelse af ligevægt vurderes ved gentagne prøvetagninger fra samme forsøgsbeholder.

*Start af testen*

40. Ved testens start fyldes reaktionsbeholderen med vand mættet med 1-octanol. Det afventes, at blandingen antager den termostaterede temperatur.

41. Den ønskede mængde teststof (opløst i det nødvendige volumen 1-octanol mættet med vand) tilsættes forsigtigt til reaktionsbeholderen. Dette er et afgørende trin i testen, da det er nødvendigt at undgå turbulent opblanding af de to faser. Til dette formål kan 1-octanol-fasen langsomt afpipetteres op mod væggen af testbeholderen, tæt på vandoverfladen. Den vil derved flyde ned ad glasvæggen og danne en film på oversiden af vandfasen. Dekanter aldrig 1-octanol direkte i kolben; undgå, at der drypper 1-octanol direkte ned i vandet.

42. Efter start af omrøringen skal omrøringshastigheden øges langsomt. Hvis omrørermotoren ikke kan indstilles passende, må brug af en transformator overvejes. Omrøringshastigheden skal indstilles, så der dannes en hvirvel med en dybde på 0,5 til højst 2,5 cm i grænsefladen mellem vand og 1-octanol. Hvis hvirvlens dybde er over 2,5 cm, skal omrøringshastigheden mindskes, da der ellers kan dannes mikrodråber af 1-octanol i vandfasen, hvilket vil medføre overvurdering af teststofkoncentrationen i vandet. Den anbefalede maksimale omrøringshastighed svarende til 2,5 cm er baseret på resultaterne af ring-testen (5). Den repræsenterer et kompromis mellem hurtigst mulig ækvilibrering og begrænsning af dannelsen af mikrodråber af 1-octanol.

▼M4

*Prøveudtagning og behandling af prøverne*

43. Ved prøvetagning skal omrøreren være afbrudt, og bevægelsen i væskerne skal være ophørt. Når prøverne er taget, startes omrøreren igen langsomt som ovenfor beskrevet, hvorefter hastigheden øges gradvis.

44. Prøver af vandfasen tages fra en hane i bunden af reaktionsbeholderen. Dødvolumenet af vand i hanerne skal altid kasseres (i den i tillæg 2 viste beholder er det ca. 5 ml). Vandet i hanerne bliver ikke omrørt og er derfor ikke i ligevægt med hovedmængden. Notér volumenet af vandprøverne, og sørg for, at indholdet af teststof i det kasserede vand medregnes ved opstilling af massebalancen. Fordampningstabet skal minimeres ved at lade vandet løbe roligt ned i skilletragten, så laget af vand/1-octanol ikke forstyrres.

45. Prøverne af 1-octanol fås ved at udtage en lille aliquot (ca. 100 µl) fra 1-octanol-laget med en 100 mikroliter sprøjte udført helt i glas-metal. Der skal udvises forsigtighed for at ikke at forstyrre grænsefladen. Volumenet af den udtagne væskeprøve noteres. En lille aliquot er tilstrækkeligt, da prøven af 1-octanol bliver fortyndet.

46. Overflødige overførselstrin for prøverne bør undgås. Der benyttes derfor vejning til bestemmelse af prøvevolumenet. For vandprøvernes vedkommende kan dette ske ved opsamling af vandprøven i en skilletragt, der i forvejen indeholder det nødvendige volumen opløsningsmiddel.

DATA OG RAPPORTERING

47. I denne metode bestemmes $P_{OW}$ ved tre slow-stirring-test (tre forsøgsenheder) med det undersøgte stof under identiske betingelser. Den regressionslinje, der anvendes til påvisning af ligevægt, skal være baseret på resultaterne af mindst fire på hinanden følgende bestemmelser af $C_O/C_W$. Derved kan variansen beregnes som et mål for usikkerheden på det beregnede gennemsnit for hver forsøgsenhed.

48. $P_{OW}$ kan karakteriseres ved variansen af de data, der opnås for hver forsøgsenhed. På grundlag heraf beregnes $P_{OW}$ som det vægtede gennemsnit af resultaterne fra de enkelte forsøgsenheder. Ved beregningen vægtes resultaterne for forsøgsenhederne med deres reciprokke varians. Derved opnås, at data med stor variation (udtrykt ved variansen) og dermed mindre pålidelighed får mindre indflydelse på resultatet end data med lille varians.

49. Analogt hermed beregnes den vægtede standardafvigelse. Denne karakteriserer repeterbarheden af målingen af $P_{OW}$. Hvis den vægtede standardafvigelse er lav, har $P_{OW}$-bestemmelsen en høj grad af repeterbarhed inden for samme laboratorium. Den formelle statistiske behandling af data er beskrevet nedenfor.

▼M4

**Behandling af resultater**

*Påvisning af opnåelse af ligevægt*

50. For hvert prøvetagningstidspunkt beregnes logaritmen til forholdet mellem teststoffets koncentration i 1-octanol og vand (log ($C_O/C_W$)). Opnåelse af kemisk ligevægt påvises ved afbildning af dette forhold mod tiden. Når denne kurve går over i et plateau bestående af mindst fire på hinanden følgende tidspunkter, er ligevægt nået, og stoffet er reelt opløst i 1-octanol. Hvis ikke, må testen fortsættes, indtil fire på hinanden følgende tidspunkter giver en hældning, der ikke er signifikant forskellig fra 0 ved et p-niveau på 0,05 som tegn på, at $C_O/C_W$ er uafhængig af tiden.

*Beregning af log $P_{OW}$*

51. Log $P_{OW}$ for den pågældende forsøgsenhed beregnes som det vægtede gennemsnit af log $C_o/C_w$ for den del af kurven over log $C_o/C_w$ som funktion af tiden, hvor ligevægt er påvist at være indtrådt. Det vægtede gennemsnit beregnes ved at vægte data med den reciprokke varians, så indflydelsen af data på slutresultatet bliver omvendt proportional med usikkerheden på data.

*Gennemsnitlig log $P_{OW}$*

52. Gennemsnitsværdien af log $P_{OW}$ for forskellige forsøgsenheder beregnes som gennemsnittet af resultaterne for de enkelte forsøgsenheder, vægtet med den pågældende varians.

Beregningen foretages således:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

hvor:

$\log P_{OW,i}$ = værdien af log $P_{OW}$ for den individuelle forsøgsenhed i

$\log P_{OW,Av}$ = det vægtede gennemsnit af de enkelte bestemmelser af log $P_{OW}$

$w_i$ = den statistiske vægt, der tildeles værdien af log $P_{OW}$ for den individuelle forsøgsenhed i

Den reciprokke varians af log $P_{OW,i}$ anvendes som $w_i$ ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. Fejlen på gennemsnittet af log $P_{OW}$ beregnes som repeterbarheden af log $C_O/C_W$, bestemt i ligevægtsfasen i de enkelte forsøgsenheder. Den udtrykkes som den vægtede standardafvigelse på log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), der igen er et mål for fejlen på log $P_{OW,Av}$. Den vægtede standardafvigelse kan beregnes af den vægtede varians $var_{\log Pow,Av}$ på følgende måde:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Symbolet n er antal forsøgsenheder.

▼M4

**Testrapport**

54. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

*Teststof:*

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (som viser placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se afsnit 17)

— renhed (urenheder) af teststoffet

— for mærkede kemikalier, nominel renhed af radioaktiv mærkning samt molær aktivitet (hvis relevant)

— den foreløbige anslåede værdi af log $P_{OW}$ og den metode, hvormed denne værdi er beregnet.

*Testbetingelser:*

— dato for testenes udførelse

— testtemperaturen

— volumen 1-octanol og vand ved testens start

— volumen af de udtagne prøver af 1-octanol og vand

— volumen 1-octanol og vand, der er tilbage i testbeholderne

— beskrivelse af forsøgsbeholdere og omrøringsforhold (den geometriske form af omrørermagneten og af forsøgsbeholderen, hvirvelhøjden i mm samt omrøringshastigheden, når denne kendes)

— de analysemetoder, der er anvendt til bestemmelse af teststoffet, og metodernes kvantificeringsgrænse

— prøvetagningstidspunkter

— pH af den vandige fase og, når pH justeres for ioniserbare molekyler, de anvendte buffere

— antal gentagelser.

*Resultater:*

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— de fundne koncentrationer af teststoffet i 1-octanol og vand som funktion af tiden

— opstilling af en massebalance

— temperatur og standardafvigelse, eller temperaturområde under testen

— regression af koncentrationsforholdet på tiden

— gennemsnitlig log $P_{ow,Av}$-værdi og standardfejlen herpå

— diskussion og fortolkning af resultaterne

▼M4

— eksempler på rådata for repræsentative analyser (alle rådata skal opbevares i henhold til GLP-normer), herunder genfindingsværdier for surrogater, antal niveauer anvendt ved kalibrering (sammen med kriterierne for korrelationskoefficienten for kalibreringskurven) og resultaterne af QA/QC

— når den foreligger: valideringsrapport for assaymetoden (angives under referencer).

*LITTERATUR:*

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the »slow-stirring« method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.

(3) Kapitel A.8 i dette bilag, Fordelingskoefficient.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Kapitel A.6 i dette bilag, Vandopløselighed.

(11) Kapitel C.7 i dette bilag, Nedbrydning — Abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH.

(12) Kapitel C.4 — del II til VII (Metode A til F) i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(13) Kapitel A.4 i dette bilag, Damptryk.

(14) Pinsuwan S, Li A og Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 til 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

▼M4

*Tillæg 1*

**Regneark til beregning af mindste vandvolumen, der er nødvendigt til detektion af teststoffer med forskellige log $P_{OW}$-værdier i vandig fase**

Forudsætninger:

— Maksimumsvolumen af de enkelte aliquoter = 10 % af totalvolumenet; 5 aliquoter = 50 % af totalvolumenet.

— Teststofkoncentration = $0,7 \times$ opløselighedenihverfase. Ved lavere koncentration skal der bruges større volumener.

— Anvendt volumen til bestemmelse af detektionsgrænse = 100 ml.

— Log $P_{OW}$ mod log $S_W$ og log $P_{OW}$ mod SR ($S_{OCT}/S_W$) er rimelige fremstillinger af de sammenhænge, der gælder for teststofferne.

*Beregning af $S_w$*

| log $P_{ow}$ | ligning | log $S_w$ | $S_w$ (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 4 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | 0,496 | 3,133E + 00 |
| 4,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | 0,035 | 1,084E + 00 |
| 5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 0,426 | 3,750E-01 |
| 5,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 0,887 | 1,297E-01 |
| 6 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 1,348 | 4,487E-02 |
| 6,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 1,809 | 1,552E-02 |
| 7 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 2,270 | 5,370E-03 |
| 7,5 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 2,731 | 1,858E-03 |
| 8 | $(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$ | – 3,192 | 6,427E-04 |

*Beregning af $S_{oct}$*

| log $P_{ow}$ | ligning | $S_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|
| 4 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$ | 3,763E + 04 |
| 4,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$ | 4,816E + 04 |
| 5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$ | 6,165E + 04 |
| 5,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$ | 7,890E + 04 |
| 6 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$ | 1,010E + 05 |
| 6,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$ | 1,293E + 05 |
| 7 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$ | 1,654E + 05 |
| 7,5 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$ | 2,117E + 05 |
| 8 | $\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$ | 2,710E + 05 |

▼**M4**

| Total masse af teststof (mg) | $Mass_{oct}/Mass_{water}$ | $Mass_{H2O}$ (mg) | $Conc_{H2O}$ (mg/l) | $Mass_{oct}$ (mg) | $Conc_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 319 | 526 | 2,5017 | 2,6333 | 1 317 | 26 333 |
| 1 686 | 1 664 | 1,0127 | 1,0660 | 1 685 | 33 709 |
| 2 158 | 5 263 | 0,4099 | 0,4315 | 2 157 | 43 149 |
| 2 762 | 16 644 | 0,1659 | 0,1747 | 2 762 | 55 230 |
| 3 535 | 52 632 | 0,0672 | 0,0707 | 3 535 | 70 691 |
| 4 524 | 1664 36 | 0,0272 | 0,0286 | 4 524 | 90 480 |
| 5 790 | 5263 16 | 0,0110 | 0,0116 | 5 790 | 115 807 |
| 7 411 | 1 664 357 | 0,0045 | 0,0047 | 7 411 | 148 223 |
| 9 486 | 5 263 158 | 0,0018 | 0,0019 | 9 486 | 189 713 |

*Beregning af volumener*

**Nødvendigt minimumsvolumen for $H_2O$-fasen ved hver LOD-koncentration**

| $\log K_{ow}$ | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | | 0,04 | 0,38 | 3,80 | 38 | 380 |
| 4,5 | | 0,09 | 0,94 | 9,38 | 94 | 938 |
| 5 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 232 | 2 318 |
| 5,5 | | 0,57 | 5,73 | 57,26 | 573 | 5 726 |
| 6 | | 1,41 | 14,15 | 141 | 1 415 | 14 146 |
| 6,5 | | 3,50 | 34,95 | 350 | 3 495 | 34 950 |
| 7 | | 8,64 | 86,35 | 864 | 8 635 | 86 351 |
| 7,5 | | 21,33 | 213 | 2 133 | 21 335 | 213 346 |
| 8 | | 52,71 | 527 | 5 271 | 52 711 | 527 111 |
| Volumen anvendt til LOD (l) | 0,1 | | | | | |

*Nøgle til beregninger*

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 1-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 2-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 5-liters ækvilibreringsbeholder.

Repræsenterer < 10 % af totalt volumen af vandig fase, 10-liters ækvilibreringsbeholder.

Over 10 % af selv 10-liters ækvilibreringsbeholderen.

▼M4

**Oversigt over nødvendigt volumen som funktion af vandopløselighed og log $P_{ow}$**

Minimumsvolumen til $H_2O$-fasen ved hver LOD-koncentration (ml)

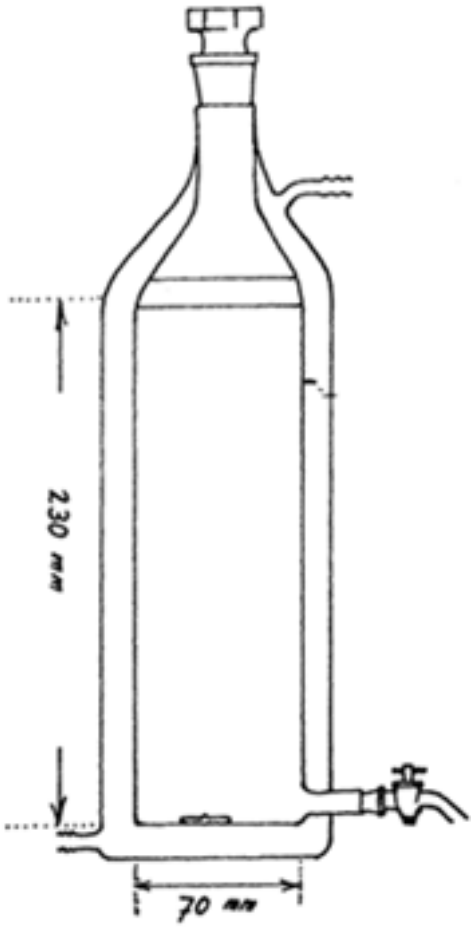
| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 10 | | 0,01 | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 |
| | 5 | | 0,02 | 0,24 | 2,38 | 23,80 | 237,97 |
| | 3 | | 0,04 | 0,40 | 3,97 | 39,66 | 396,62 |
| | 1 | | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 | 1 189,86 |
| 4,5 | 5 | | 0,02 | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 |
| | 2 | | 0,05 | 0,51 | 5,08 | 50,84 | 508,42 |
| | 1 | | 0,10 | 1,02 | 10,17 | 101,68 | 1 016,83 |
| | 0,5 | | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 | 2 033,67 |
| 5 | 1 | | 0,09 | 0,87 | 8,69 | 86,90 | 869,01 |
| | 0,5 | | 0,17 | 1,74 | 17,38 | 173,80 | 1 738,02 |
| | 0,375 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 231,75 | 2 317,53 |
| | 0,2 | | 0,43 | 4,35 | 43,45 | 434,51 | 4 345,05 |
| 5,5 | 0,4 | | 0,19 | 1,86 | 18,57 | 185,68 | 1 856,79 |
| | 0,2 | | 0,37 | 3,71 | 37,14 | 371,36 | 3 713,59 |
| | 0,1 | | 0,74 | 7,43 | 74,27 | 742,72 | 7 427,17 |
| | 0,05 | | 1,49 | 14,85 | 148,54 | 1 485,43 | 14 854,35 |
| 6 | 0,1 | | 0,63 | 6,35 | 63,48 | 634,80 | 6 347,95 |
| | 0,05 | | 1,27 | 12,70 | 126,96 | 1 269,59 | 12 695,91 |
| | 0,025 | | 2,54 | 25,39 | 253,92 | 2 539,18 | 25 391,82 |
| | 0,0125 | | 5,08 | 50,78 | 507,84 | 5 078,36 | 50 783,64 |
| 6,5 | 0,025 | | 2,17 | 21,70 | 217,02 | 2 170,25 | 21 702,46 |
| | 0,0125 | | 4,34 | 43,40 | 434,05 | 4 340,49 | 43 404,93 |
| | 0,006 | | 9,04 | 90,43 | 904,27 | 9 042,69 | 90 426,93 |
| | 0,003 | | 18,09 | 180,85 | 1 808,54 | 18 085,39 | 180 853,86 |
| 7 | 0,006 | | 7,73 | 77,29 | 772,89 | 7 728,85 | 77 288,50 |
| | 0,003 | | 15,46 | 154,58 | 1 545,77 | 15 457,70 | 154 577,01 |
| | 0,0015 | | 23,19 | 231,87 | 2 318,66 | 23 186,55 | 231 865,51 |
| | 0,001 | | 46,37 | 463,73 | 4 637,31 | 46 373,10 | 463 731,03 |
| 7,5 | 0,002 | | 19,82 | 198,18 | 1 981,77 | 19 817,73 | 198 177,33 |
| | 0,001 | | 39,64 | 396,35 | 3 963,55 | 39 635,47 | 396 354,66 |
| | 0,0005 | | 79,27 | 792,71 | 7 927,09 | 79 270,93 | 792 709,32 |

▼**M4**

| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (mikrogram/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,00025 | | 158,54 | 1 585,42 | 15 854,19 | 158 541,86 | 1 585 418,63 |
| 8 | 0,001 | | 33,88 | 338,77 | 3 387,68 | 33 876,77 | 338 767,72 |
| | 0,0005 | | 67,75 | 677,54 | 6 775,35 | 67 753,54 | 677 535,44 |
| | 0,00025 | | 135,51 | 1 355,07 | 13 550,71 | 135 507,09 | 1 355 070,89 |
| | 0,000125 | | 271,01 | 2 710,14 | 27 101,42 | 271 014,18 | 2 710 141,77 |
| Volumen anvendt til LOD (l) | | 0,1 | | | | | |

*Tillæg 2*

**Eksempel på beholder med glaskappe til slow-stirring-test til bestemmelse af $P_{OW}$**



▼B

**DEL B: METODER TIL BESTEMMELSE AF TOKSICITET OG ANDRE SUNDHEDSVIRKNINGER**

Indholdsfortegnelse


GENEREL INDLEDNING

B.1.A. AKUT ORAL TOKSICITET — FASTDOSISMETODEN

B.1.B. AKUT ORAL TOKSICITET — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN

B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

B.3. AKUT TOKSICITET (DERMAL)

B.4. AKUT TOKSICITET: HUDIRRITATION/ÆTSNING

B.5. AKUT TOKSICITET, ØJENIRRITATION

B.6. HUDSENSIBILISERING

B.7. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL) HOS GNAVERE

B.8. SUBAKUT TOKSICITET (INHALATION): 28-DAGES FORSØG

B.9. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)

B.10. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR

B.11. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR

B.12. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

B.13/14. MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER

B.15. MUTAGENICITETSTESTNING OG SCREENING FOR KARCINOGENICITET GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

B.16. MITOTISK REKOMBINATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

B.17. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER

B.18. DNA-SKADE OG DNA-REPARATION — UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS — PATTEDYRCELLER IN VITRO

B.19. SØSTERKROMATID OMBYGNING (SCE) IN VITRO

B.20. KØNSBUNDET RECESSIV LETAL TEST — DROSOPHILA MELANOGASTER

▼B

| | |
|---|---|
| B.21. | CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO |
| B.22. | DOMINANT LETAL TEST — GNAVER |
| B.23. | TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR |
| B.24. | SPOTTEST — MUS |
| B.25. | ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS |
| B.26. | SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE |
| B.27. | SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ IKKE-GNAVERE |
| B.28. | SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN — 90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE |
| B.29. | SUBKRONISK TOKSICITET (INHALATION): 90-DAGES FORSØG |
| B.30. | FORSØG VEDRØRENDE KRONISK TOKSICITET |
| B.31. | PRÆNATAL UDVIKLINGSTOKSICITETSUNDERSØGELSE |
| B.32. | KARCINOGENICITETSFORSØG |
| B.33. | KOMBINERET FORSØG VEDRØRENDE KARCINOGENICITET/KRONISK TOKSICITET |
| B.34. | REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION |
| B.35. | REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER |
| B.36. | TOKSIKOKINETIK |
| B.37. | FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER EFTER AKUT EKSPONERING |
| B.38. | FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER GENTAGEN DOSIS — 28 DAGE |
| B.39. | TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTESE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO |
| B.40. | IN VITRO-HUDÆTSNING: MÅLING AF TRANSKUTAN-ELEKTRISK MODSTAND (TER) |
| B.40.A. | IN VITRO-HUDÆTSNING: TEST MED HUMAN HUDMODEL |

▼**B**

| | |
|---|---|
| B.41. | IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST |
| B.42. | HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER |
| B.43. | NEUROTOKSICITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE |
| B.44. | HUDABSORPTION: IN VIVO-METODE |
| B.45. | HUDABSORPTION: IN VITRO-METODE |
| B.46. | IN VITRO-HUDIRRITATION: TESTMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS |
| B.47. | OKSECORNEA-UKLARHEDS- OG -PERMEABILITETSTESTMETODEN (BCOP-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER |
| B.48. | ISOLERET KYLLINGEØJE-TESTMETODEN (ICE-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER |
| B.49. | IN VITRO-MIKROKERNETEST I PATTEDYRCELLER |
| B.50. | HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: DA |
| B.51. | HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: BrdU-ELISA |

▼**M4**

| | |
|---|---|
| B.52. | AKUT TOKSICITET (INHALATION) — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN |

▼B

## GENEREL INDLEDNING

### A. BESKRIVELSE AF TESTSTOFFET

Teststoffets sammensætning, herunder de vigtigste urenheder, og dets relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder dets stabilitet, skal være kendt forud for enhver undersøgelse af toksicitet.

Teststoffets fysisk-kemiske egenskaber giver en række vigtige oplysninger for valget af administrationsmåde, udformningen af hver enkelt undersøgelse samt håndtering og opbevaring af teststoffet.

Forud for undersøgelsen bør der udvikles en analysemetode til kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af stoffet (herunder vigtige urenheder, såfremt dette er muligt) i doseringsmediet og i det biologiske materiale.

Alle oplysninger om teststoffets identitet, fysisk-kemiske egenskaber, renhed og adfærd medtages i testrapporten.

### B. PASNING AF DYR

Ved toksicitetstest er det afgørende, at der føres nøje kontrol med testmiljøet, og at dyrene passes korrekt.

i) *Miljø*

Miljøet i forsøgsstalde og -bure skal afpasses efter dyrearten. For rotter, mus og marsvin er en rumtemperatur på 22 ± 3 °C og en relativ luftfugtighed på 30-70 % passende; for kaniner bør temperaturen være på 20 ± 3 °C og den relative luftfugtighed på 30-70 %.

Nogle forsøgsteknikker er særlig følsomme over for temperaturafvigelser, og i sådanne tilfælde indeholder beskrivelsen af testmetoden nærmere oplysninger om passende forsøgsbetingelser. Ved alle undersøgelser af toksiske virkninger skal temperaturen og luftfugtigheden kontrolleres, registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Der bør anvendes kunstig belysning, som følger en rytme med 12 timers lys og 12 timers mørke. Oplysninger om belysningsrytmen registreres og anføres i den afsluttende forsøgsrapport.

Medmindre andet er angivet i metoden, kan dyrene opbevares i bure hver for sig eller i små grupper af samme køn, dog højst fem dyr pr. bur.

I rapporter over dyreforsøg er det vigtigt at anføre, hvilken type bure der er anvendt, og hvor mange dyr der har været i hvert bur, såvel under eksponering for det kemiske stof som i en efterfølgende observationsperiode.

▼B

ii) *Fodring*

Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller. Hvis teststofferne indgives med foder, kan reaktioner mellem teststoffet og foderbestanddele medføre, at næringsværdien nedsættes. Muligheden af en sådan reaktion skal tages i betragtning, når forsøgsresultaterne fortolkes. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Valget af foder kan afhænge af, at teststoffet skal kunne iblandes foderet på passende måde, hvis teststoffet indgives med foderet.

Forureninger i foderet, som vides at influere på toksiciteten, må ikke forefindes i interfererende koncentrationer.

C. **ALTERNATIV TESTNING**

Den Europæiske Union har sat sig som mål at udvikle og validere alternative metoder, som kan give oplysninger på samme niveau som de nuværende dyreforsøg, men som anvender færre dyr, forårsager mindre smerte, eller hvor brugen af dyr fuldstændig kan undgås.

Efterhånden som sådanne metoder udvikles, skal de så vidt muligt tages i anvendelse i forbindelse med risikobeskrivelse og efterfølgende klassifikation og etikettering baseret på den potentielle fare ved de pågældende stoffer.

D. **VURDERING OG FORTOLKNING**

Ved vurdering og fortolkning af resultaterne af dyreforsøg og in vitro-undersøgelser skal der tages hensyn til, at der er grænser for, i hvilket omfang de kan ekstrapoleres direkte til mennesker, dokumentation for skadelige virkninger på mennesker, hvor sådan foreligger, skal derfor anvendes til at bekræfte testresultaterne.

E. **HENVISNINGER**

De fleste af disse metoder er udviklet inden for rammerne af OECD's program for retningslinjer for forsøgsvirksomhed (OECD-Test Guidelines) og bør udføres i overensstemmelse med principperne for god laboratoriepraksis, så der kan opnås størst mulig »gensidig accept af data«.

Yderligere oplysninger kan findes i henvisningerne i OECD-retningslinjerne og relevant litteratur, der er offentliggjort andetsteds.

▼B

B.1.A. **AKUT ORAL TOKSICITET — FASTDOSISMETODEN**

1. **METODE**

Denne forsøgsmetode svarer til OECD TG 420 (2001)

1.1. INDLEDNING

I traditionelle metoder til bestemmelse af akut giftighed anvendes dyrenes død som effektparameter. I 1984 foreslog British Toxicology Society en ny metode til bestemmelse af akut giftighed, baseret på administration af stoffet i en række faste dosisniveauer (1). Med denne metode undgik man at anvende dyrenes død som effektparameter, men støttede sig i stedet til observation for tydelige tegn på toksicitet ved et af en række faste dosisniveauer. Efter in vivo-validering, dels i Det Forenede Kongerige (2), dels internationalt (3), blev metoden indført som forsøgsmetode i 1992. Efterfølgende er de statistiske egenskaber af fastdosismetoden evalueret ved hjælp af matematiske modeller i en række undersøgelser (4}(5)(6). Tilsammen har in vivo-undersøgelser og modelforsøg vist, at metoden er reproducerbar, kræver færre dyr og medfører færre lidelser end traditionelle metoder, og at den gør det muligt at rangordne stofferne på tilsvarende måde som andre metoder til bestemmelse af akut giftighed.

Vejledning i valg af den mest hensigtsmæssige forsøgsmetode til et givet formål kan findes i Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). Samme dokument indeholder desuden supplerende oplysninger om udførelse og fortolkning af forsøg efter metode B.1.A.

Undersøgelsens princip indebærer, at der i hovedundersøgelsen kun anvendes moderat toksiske doser, og at man undgår at administrere doser, som forventes at være dødelige. Ligeledes undgår man at administrere doser, der vides at medføre udtalt smerte og lidelse pga. ætsende eller stærkt irriterende virkning. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant og betragtes ved fortolkningen af forsøgsresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under forsøget, Kriterierne for aflivning af moribunde eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (8).

Metoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at rangordne og klassificere stofferne efter det globale harmoniserede system (GHS) til klassificering af kemiske stoffer med akut toksisk virkning (9).

Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre in vitro- eller in vivo-tokstcitetsundersøgelser af stoffet, toksikologiske data for strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige for til alle parters tilfredshed at godtgøre, at forsøget har betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af passende startdosis.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Akut oral toksicitet**: de sundhedsmæssigt uønskede virkninger, som optræder efter oral indgift af en enkelt dosis af et teststof eller efter flere doser indgivet i løbet af 24 timer.

**Forsinket død**: det forhold, at dyret ikke inden for 48 timer dør eller fremtræder moribund, men dør senere inden for den 14 dage lange observationsperiode.

**Dosis**: den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg).

**Synlig toksicitet**: et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgift af teststoffet (eksempler herpå findes i (3)), således at der ved den næsthøjeste faste dosis enten kan forventes svære smerter og vedvarende tegn på svære lidelser, moribund status (kriterier herfor er beskrevet i Humane Endpoints Guidance Document (8)), eller størstedelen af dyrene forventes at dø.

**GHS**: Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Et fælles projekt mellem OECD (sundhed og miljø), FN's ekspertudvalg vedrørende transport af farligt gods (fysisk-kemiske egenskaber) og ILO (faremærkning og -angivelse), koordineret af Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

**Overhængende død**: det forhold, at moribund tilstand eller død forventes at indtræffe inden næste planlagte observationstidspunkt. Som tegn på denne tilstand i gnavere kan nævnes kramper, sideleje, liggende stilling og tremor.

**$LD_{50}$ (middel letaldosis)**: den statistisk beregnede enkeltdosis af et teststof, som ved oral indgift kan forventes at medføre døden hos 50 % af dyrene, $LD_{50}$-værdien angives som vægtmængde teststof pr, vægtenhed kropsvægt af forsøgsdyret.

**Grænsedosis**: en dosis, som danner øvre grænse for testen (2 000 eller 5 000 mg/kg).

**Moribund tilstand**: en tilstand, hvor dyret er døende eller ikke vil overleve, selv om det behandles (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (8)).

**Forudsigelig død**: tilstedeværelse af kliniske tegn, som antyder, at døden vil indtræffe på et kendt tidspunkt før forsøgets planlagte afslutning, f.eks. at dyret er ude af stand til at bevæge sig hen til vand eller føde (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (8)).

▼B

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Grupper af dyr af samme køn modtager trinvis stigende faste doser på 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg (undtagelsesvis kan anvendelse af en yderligere fast dosis på 5 000 mg/kg overvejes, se punkt 1.6.2). På grundlag af en forundersøgelse vælges begyndelsesdosis som den dosis, der forventes at frembringe nogen tegn på toksicitet uden at medføre svær toksisk effekt eller dødelighed. De kliniske tegn og forhold, der er forbundet med smerte, lidelse og forestående død, er detaljeret beskrevet i en separat OECD-vejledning (8). Yderligere grupper af dyr kan behandles med højere eller lavere faste doser. Denne procedure fortsættes, indtil man har fastlagt den dosis, som medfører synlig toksicitet eller højst ét dødsfald, eller der ikke ses nogen effekt af den højeste dosis, eller der optræder dødsfald ved den laveste dosis.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, men en anden gnaverart kan anvendes. Sædvanligvis anvendes hundyr (7). Baggrunden herfor er, at litteraturundersøgelser af konventionelle $LD_{50}$-forsøg viser, at de to køn sædvanligvis ikke udviser stor forskel i følsomhed, men hvis der er forskel, er hundyr sædvanligvis lidt mere følsomme end handyr (10). Foreligger der imidlertid for strukturelt beslægtede stoffer oplysninger om toksikologiske eller toksikokinetiske egenskaber, som tyder på, at hanner må forventes at være mere følsomme end hunner, bør handyr anvendes. Udføres forsøget i hanner, skal fyldestgørende begrundelse herfor gives.

Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvert dyr skal ved doseringens begyndelse være mellem 8 og 12 uger gammelt, og dets vægt afvige højst ± 20 % fra gennemsnitsvægten af eventuelle tidligere behandlede dyr.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrsrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke være over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes, Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand, Dyrene i en given dosisgruppe kan være anbragt i samme bur, men antallet af dyr i buret må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr.

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

▼B

1.4.4. **Tilberedning af doser**

Sædvanligvis bør teststoffet administreres i samme volumen på alle de anvendte dosisniveauer, idet man varierer koncentrationen i præparatet. Når det færdige testpræparat eller den færdige testblanding er flydende, kan anvendelse af ufortyndet teststof, dvs. med konstant koncentration, være mest relevant for den efterfølgende risikovurdering af stoffet, og nogle myndigheder stiller da også krav herom, I begge tilfælde må det maksimale volumen for indgift ikke overskrides. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse, Til gnavere må rumfanget normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt, ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende 2 ml/100 g kropsvægt. Ved formulering af doseringspræparatets anbefales det så vidt muligt at benytte en vandig opløsning/suspension/emulsion, efterfulgt (i prioriteret rækkefølge) af en opløsning/suspension/emulsion i olie (f.eks, majsolie) og derefter eventuelt en opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt, Doserne skal tilberedes kort før indgift, medmindre præparatets holdbarhed inden for anvendelsesperioden kendes og er godtgjort at være tilfredsstillende.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Administration of doserne**

Teststoffet indgives som enkeltdosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Kan den pågældende stofmængde ikke indgives som enkeltdosis, kan den undtagelsesvis indgives opdelt i få enkelte dele af den samlede dosis over en periode på højst 24 timer.

Dyrene skal være fastende inden doseringen (f.eks. skal rotter natten over ikke have foder, men adgang til vand; mus skal i 3-4 timer ikke have foder, men adgang til vand), Efter fasteperioden vejes dyrene, og teststoffet indgives. Når stoffet er indgivet, kan dyrene unddrages føde i yderligere 3-4 timer for rotter og 1-2 timer for mus. Når en dosis indgives delt over et vist tidsrum, kan det afhængigt af dette tidsrum være nødvendigt at give dyrene foder og adgang til vand.

1.5.2. **Forundersøgelse**

Forundersøgelsen har til formål at bestemme en passende startdosis i hovedundersøgelsen. Teststoffet indgives sekventielt til de enkelte dyr som angivet i skemaerne i bilag 1. Forundersøgelsen afsluttes, når det kan afgøres, hvilken startdosis der skal anvendes i hovedundersøgelsen (eller når der er et dødsfald ved den laveste faste dosis).

Startdosis til forundersøgelsen vælges blandt de faste dosisniveauer 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg som den dosis, der forventes at medføre synlig toksicitet, om muligt baseret på dokumentation i form af in vivo- og in vitro-data for samme kemiske stof og for strukturelt beslægtede stoffer. I mangel af sådanne oplysninger anvendes en startdosis på 300 mg/kg.

Doseringerne af de enkelte dyr finder sted med et interval på mindst 24 timer. Alle dyr observeres i mindst 14 dage.

▼B

Undtagelsesvis, og kun når det kan begrundes konkret ud fra myndighedsregler, kan det overvejes at anvende et supplerende højeste fast dosisniveau på 5 000 mg/kg (se bilag 3). Af dyrevelfærdsmæssige grunde anbefales det at undgå testning i området svarende til 2 000-5 000 mg/kg i GHS kategori 5, og dette bør kun overvejes, når det er overvejende sandsynligt, at resultaterne af et sådant forsøg have direkte relevans for beskyttelsen af menneskers eller dyrs sundhed eller miljøet.

Hvis et dyr dør ved den laveste faste dosis (5 mg/kg) i forundersøgelsen, er fremgangsmåden normalt at standse forsøget og indplacere stoffet i GHS kategori 1 (som vist i bilag 1). Hvis klassificeringen kræves nærmere bekræftet, kan man dog frivilligt vælge følgende supplerende procedure: Endnu et dyr doseres med 5 mg/kg. Hvis dette dyr dør, vil det bekræfte GHS kategori 1, og undersøgelsen standses straks. Hvis dyret overlever, kan yderligere højst tre dyr behandles med 5 mg/kg. På grund af den høje dødsrisiko bør disse dyr af dyrevelfærdsmæssige grunde doseres sekventielt. Tidsrummet mellem doseringen af de enkelte dyr skal være tilstrækkeligt til at fastslå, at det foregående dyr må forventes at overleve. Indtræffer der endnu et dødsfald, skal doseringen straks indstilles, og ingen yderligere dyr doseres, Da optræden af endnu et dødsfald (uanset det testede antal dyr på ophørstidspunktet) falder ind under udfald A (to eller flere dødsfald), følger man klassificeringsreglen i bilag 2 ved fast dosis 5 mg/kg (dvs. kategori 1. hvis der er to eller flere dødsfald, og kategori 2 hvis der er højst et dødsfald), Derudover indeholder bilag 4 vejledning i, hvordan man foretager klassificeringen i EU's system, indtil det nye GHS er indført.

1.5.3. **Hovedundersøgelsen**

1.5.3.1. *Antal dyr og dosisniveauer*

De enkelte trin, der skal følges efter testning ved startdosis, er angivet i skemaerne i bilag 2. Der skal vælges en af følgende tre muligheder: enten afbrydelse af forsøget og tilordning af stoffet til den pågældende fareklasse, eller testning ved et højere fast dosisniveau, eller testning ved et lavere fast dosisniveau. Af hensyn til dyrenes beskyttelse vil et dosisniveau, der medførte død i forundersøgelsen, ikke blive gentaget i hovedundersøgelsen (se bilag 2). Erfaringen viser, at det mest sandsynlige udfald ved startdosisniveauet er, at stoffet kan klassificeres, uden at yderligere testning er nødvendig.

For hvert af de undersøgte dosisniveauer vil der normalt blive anvendt i alt fem dyr af ét køn. De fem dyr består af det dyr fra forundersøgelsen, som blev doseret ved det valgte dosisniveau, samt yderligere fire dyr (undtagen når et af hovedundersøgelsens dosisniveauer undtagelsesvis ikke indgik i forundersøgelsen).

Tidsintervallet mellem doseringerne på hvert niveau bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Behandlingen af dyrene ved næste dosering skal vente, indtil det kan antages, at de tidligere doserede dyr vil overleve. Det anbefales, at man om nødvendigt lader gå 3-4 dage mellem doseringerne på hvert dosisniveau for at få den nødvendige tid til at iagttage en eventuel forsinket toksisk virkning. Tidsintervallet kan korrigeres til en passende størrelse, f.eks. hvis den opnåede respons er inkonklusiv.

▼B

Overvejes det at anvende en fast højeste dosis på 5 000 mg/kg, følger man proceduren i bilag 3 (se også punkt 1.6.2).

1.5.3.2. *Grænsetest*

Grænsetesten anvendes fortrinsvis i situationer, hvor forsøgslederen har oplysninger om, at teststoffet må forventes at være atoksisk, dvs, kun er toksisk i doser over de grænsedoser, der er fastsat i bestemmelserne. Oplysninger om teststoffets giftighed kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller tilsvarende testede blandinger eller produkter, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning, Når der foreligger få eller slet ingen oplysninger om teststoffets toksicitet, eller når stoffet forventes at være toksisk, skal hovedundersøgelsen udføres.

Når den normale fremgangsmåde følges, vil en startdosis ved forundersøgelsen på 2 000 mg/kg (eller undtagelsesvis 5 000 mg/kg) efterfulgt af en dosering af fire yderligere dyr tjene som grænsetest med henblik på denne guideline.

1.6. OBSERVATIONER

Efter doseringen iagttages dyrene enkeltvis mindst én gang i de første 30 minutter, og periodisk de første 24 timer, under særlig opmærksomhed de første 4 timer, derefter dagligt, gennem i alt 14 dage, bortset fra tilfælde, hvor dyrene må tages ud af undersøgelsen og aflives humant af dyrevelfærdsmæssige grunde eller findes døde. Imidlertid bør observationsperioden ikke fastsættes ufravigeligt, Den bør fastlægges ud fra de toksiske reaktioners indsætten og restitutionsperiodens længde og kan således forlænges, når det skønnes nødvendigt. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer (11), Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr.

Viser dyrene fortsat tegn på toksicitet, vil supplerende observationer være nødvendige. Observationerne skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem, samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Humane Endpoints Guidance Document, skal ligeledes tages i betragtning (8). Dyr, som findes at være moribunde, og dyr, som udviser svære smerter eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

1.6.1. **Kropsvægt**

Vægten af hvert enkelt dyr bestemmes kort før indgift af teststoffet og derefter mindst én gang om ugen. Vægtændringer beregnes og registreres. Ved forsøgets slutning vejes de overlevende dyr, som derefter aflives humant.

▼B

1.6.2. **Patologi**

Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr. For dyr, som overlever i 24 timer eller længere efter den første dosering, kan man endvidere overveje mikroskopisk undersøgelse af organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer, da dette kan give nyttige oplysninger.

2. **DATA**

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover opstilles i tabelform for hver forsøgsgruppe oplysninger om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet, samt obduktionsfund.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

Teststof:

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsdata, herunder CAS-nummer.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— dyrenes antal, alder og køn (og, i givet fald, begrundelse for brug af handyr i stedet for hundyr)

— oprindelse, opstaldning, foder osv.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende teststoffets formulering, herunder beskrivelse af den fysiske tilstand af det indgivne materiale

— oplysninger om administrationen af teststoffet, herunder doseringsvolumen og doseringstidspunkt

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder foderets art og oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af startdosis.

▼B

Resultater:

— opstilling i tabelform af effekter og dosisniveau for hvert dyr (dvs, dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed og varighed)

— opstilling i tabelform af kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— de enkelte dyrs vægt på doseringsdagen, derefter med én uges mellemrum, samt på døds- eller aflivningstidspunktet

— dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før den planlagte aflivning

— for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr, obduktionsfund og, i givet fald, histopatologiske fund.

Diskussion og fortolkning af resultater.

Konklusioner,

4. **HENVISNINGER**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicitiy (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel. M.J., Dayan. A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Petling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical $LD_{50}$ test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002), Statistical evaluation of the revised fixed dose procediire.- Hum, Exp. Toxicol., 21, 183-196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

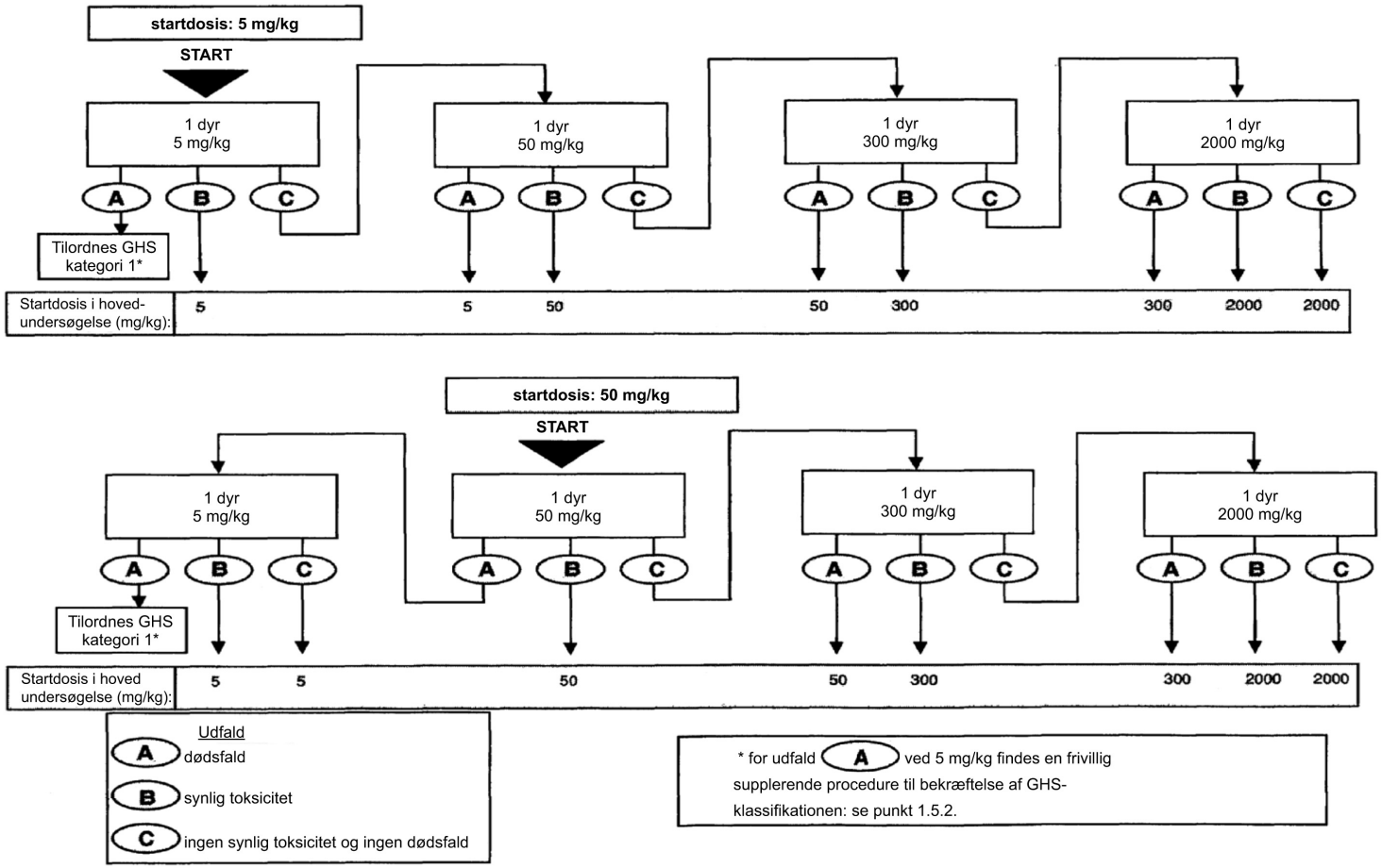
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.ll [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

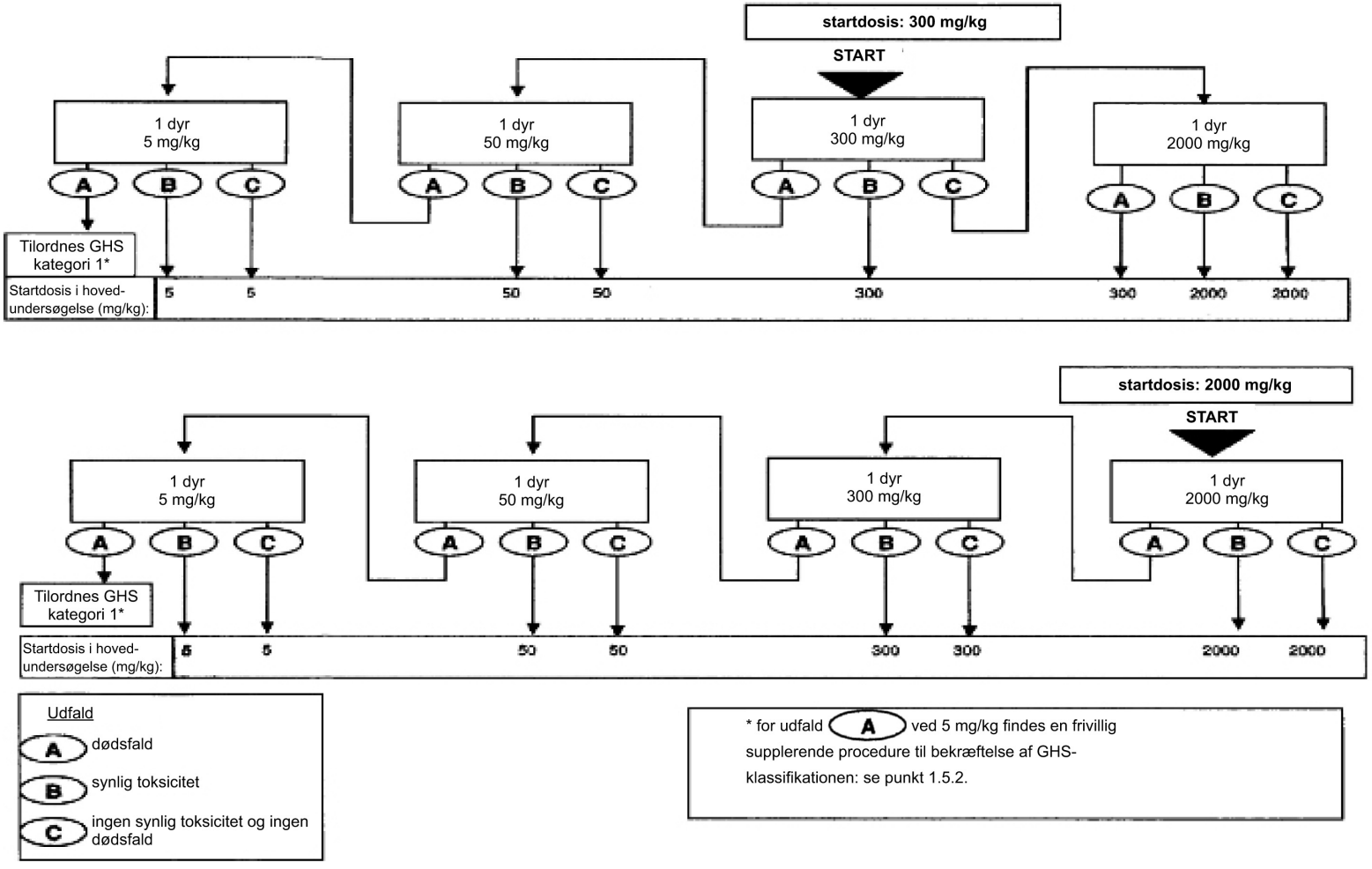
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Haves (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd New York, USA.

*BILAG 1*

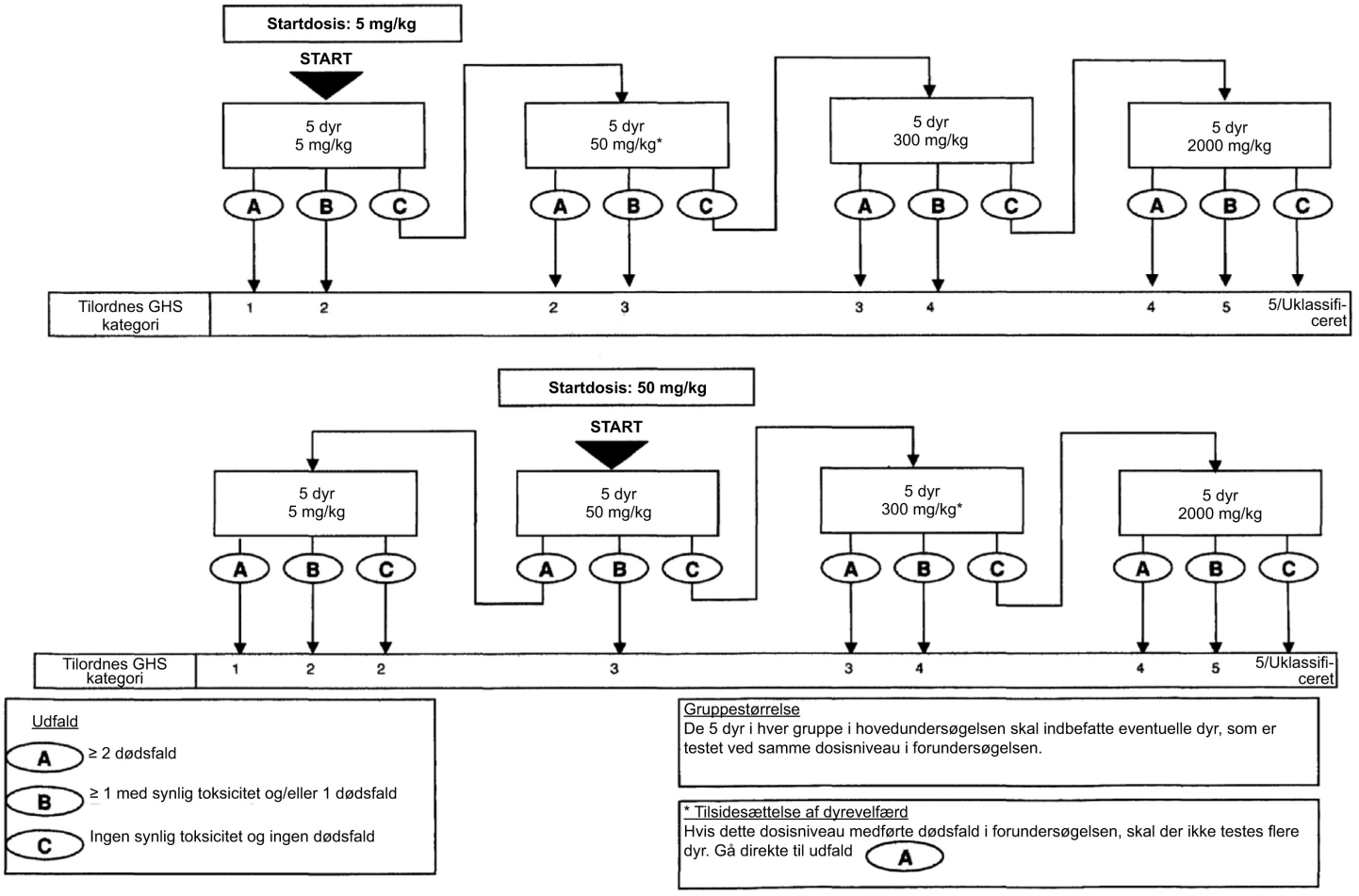
## FREMGANGSMÅDE VED FORUNDERSØGELSEN

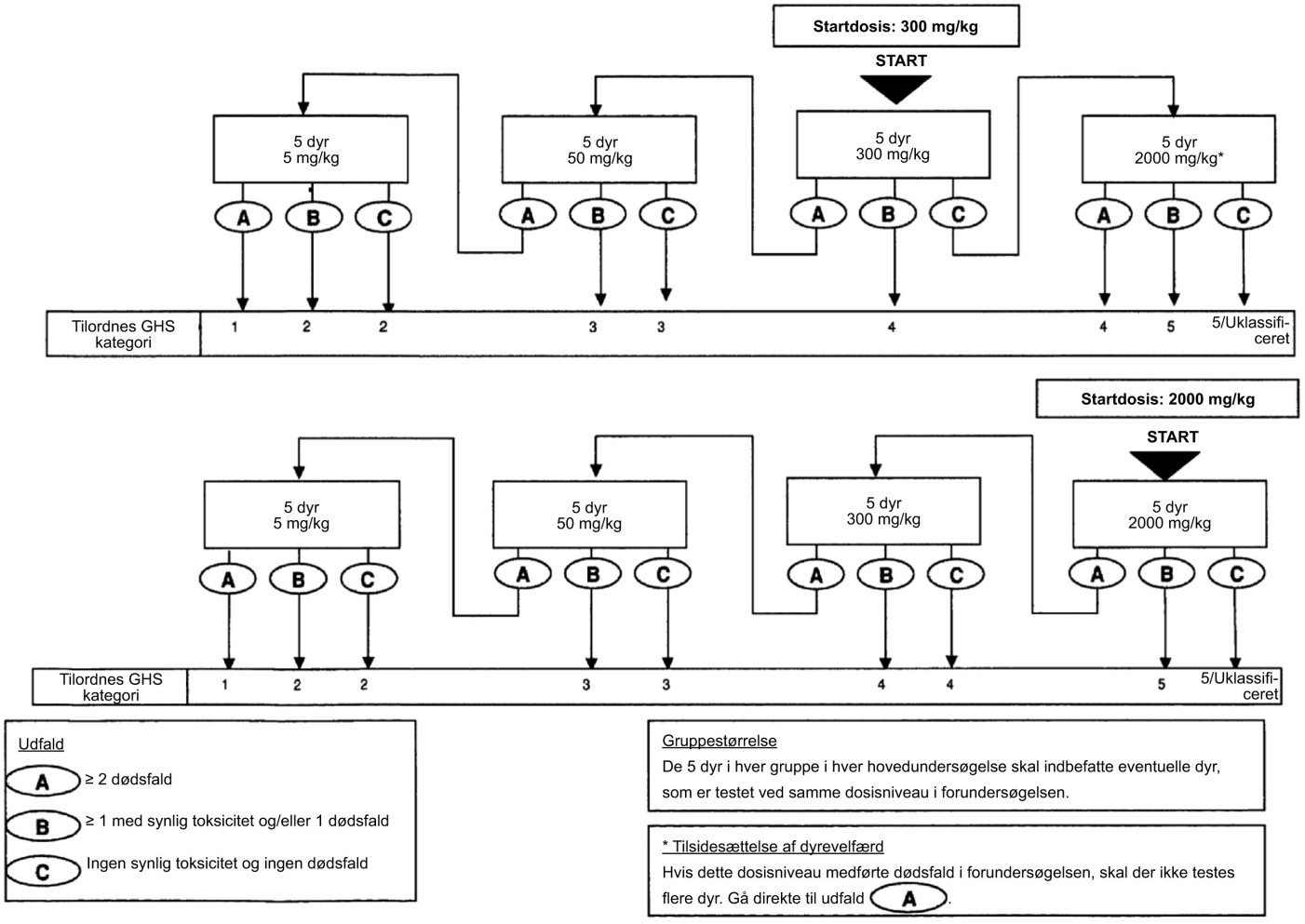



startdosis: 300 mg/kg
START
1 dyr
5 mg/kg
1 dyr
50 mg/kg
1 dyr
300 mg/kg
1 dyr
2000 mg/kg
A
B
C
Tilordnes GHS kategori 1*
Startdosis i hoved-undersøgelse (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
startdosis: 2000 mg/kg
START
1 dyr
5 mg/kg
1 dyr
50 mg/kg
1 dyr
300 mg/kg
1 dyr
2000 mg/kg
A
B
C
Tilordnes GHS kategori 1*
Startdosis i hoved-undersøgelse (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Udfald
A dødsfald
B synlig toksicitet
C ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
* for udfald A ved 5 mg/kg findes en frivillig supplerende procedure til bekræftelse af GHS-klassifikationen: se punkt 1.5.2.

*BILAG 2*

## FREMGANGSMÅDE VED HOVEDUNDERSØGELSEN




Startdosis: 300 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg*
A
B
C
Tilordnes GHS kategori
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Uklassificeret
Startdosis: 2000 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg
Tilordnes GHS kategori
1
2
2
3
3
4
4
5
5/Uklassificeret
Udfald
A ≥ 2 dødsfald
B ≥ 1 med synlig toksicitet og/eller 1 dødsfald
C Ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
Gruppestørrelse
De 5 dyr i hver gruppe i hver hovedundersøgelse skal indbefatte eventuelle dyr, som er testet ved samme dosisniveau i forundersøgelsen.
* Tilsidesættelse af dyrevelfærd
Hvis dette dosisniveau medførte dødsfald i forundersøgelsen, skal der ikke testes flere dyr. Gå direkte til udfald A.

▼B

*BILAG 3*

## KRITERIER FOR KLASSIFICERING AF TESTSTOFFER MED FORVENTET $LD_{50}$-VÆRDI OVER 2 000 MG/KG, UDEN AT TESTNING ER NØDVENDIG

Kriterierne for farekategori 5 skal give mulighed for at udpege teststoffer, som udviser relativ risiko for akut gifitighed, men som under visse omstændigheder kan udgøre en fare for følsomme populationer. For disse stoffer forventes en oral eller dermal $LD_{50}$ i området 2 000-5 000 mg/kg, eller tilsvarende doser for andre administrationsveje, I følgende tilfælde kan et teststof klassificeres i farekategorien defineret ved: 2 000 mg/kg < $LD_{50}$ < 5 000 mg/kg (kategori 5 i GHS):

a) hvis de kan tilordnes denne kategori i henhold til enhvert af skemaerne i bilag 2 på grundlag af dødsfrekvensen

b) hvis foreliggende pålidelige oplysninger viser, at $LD_{50}$ ligger i området svarende til kategori 5, eller hvis andre dyreundersøgelser eller toksiske virkninger i mennesker viser, at der er grund til stærke sundhedsmæssige betænkeligheder

c) ved ekstrapolation, skønsmæssig beregning eller måling af data, når der ikke er grundlag for at tilordne stoffet til en farligere klasse, og

   — foreliggende pålidelige oplysninger viser betydelig toksisk virkning på mennesker, eller

   — der iagttages dødelighed ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 ved oral administration, eller

   — ekspertvurderinger bekræfter, at der er væsentlige kliniske tegn på toksicitet ved testning op til værdierne svarende til kategori 4, bortset fra diarré, pilorektion eller uplejet udseende af pels, eller

   — ekspertvurderinger bekræfter pålidelige oplysninger om potentiale for væsentlige akutte virkninger i de andre dyreforsøg.

### TESTNING VED DOSER OVER 2 000 MG/KG

Et supplerende øvre fast dosisniveau på 5 000 mg/kg kan undtagelsesvis overvejes, når konkrete myndighedsbestemmelser gør det nødvendigt. Dyrevelfærdsmæssige grunde taler imod testning af dyr ved 5 000 mg/kg, og et sådant forsøg bør kun overvejes, når dets resultater med overvejende sandsynlighed vil få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed (9),

**Forundersøgelse**

Reglerne i bilag 1 for anvendelse af den sekventielle metode udvides til at omfatte dosisniveauet 5 000 mg/kg. Når startdosis i forundersøgelsen er 5 000 mg/kg, vil udfald A (død) kræve testning af endnu et dyr ved 2 000 mg/kg; udfald B og C (synlig toksicitet eller ingen toksicitet) vil tillade, at 5 000 mg/kg vælges som startdosis i hovedundersøgelsen. Tilsvarende gælder, at hvis der anvendes en anden startdosis end 5 000 mg/kg, skal forsøget udvides til 5 000 mg/kg i tilfælde af udfald B eller C ved 2 000 mg/kg; fås derefter udfald A ved 5 000 mg/kg, skal startdosis i hovedundersøgelsen være 2 000 mg/kg, og fås udfald B og C, skal startdosis i hovedundersøgelsen være 5 000 mg/kg

▼B

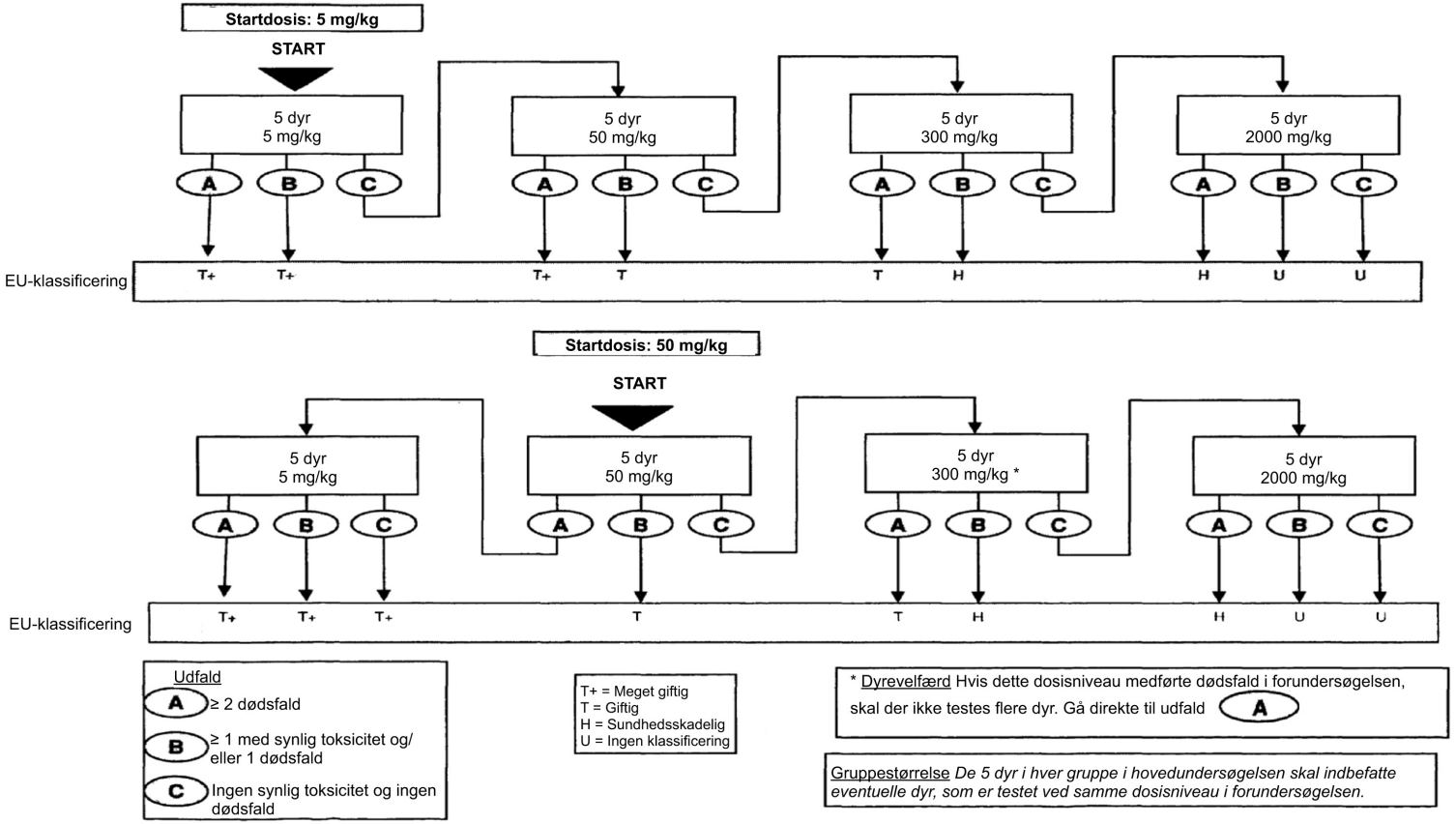
**Hovedundersøgelse**

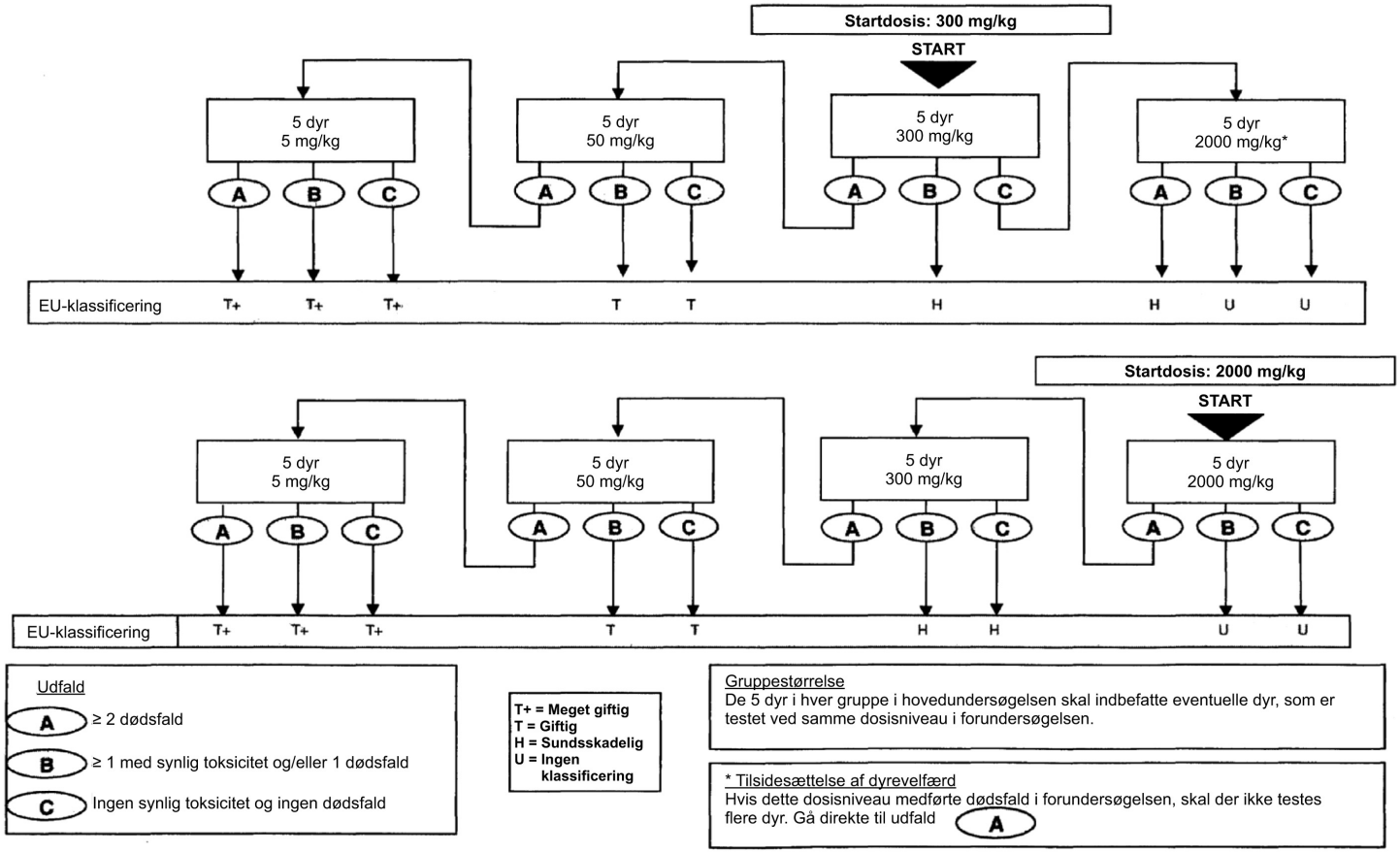
Reglerne i bilag 2 for anvendelse af den sekventielle metode udvides til at omfatte dosisniveauet 5 000 mg/kg, Når startdosis i forundersøgelsen er 5 000 mg/kg, vil udfald A (≥ 2 dødsfald) kræve testning af endnu en gruppe ved 2 000 mg/kg; udfald B (synlig toksicitet og/eller ≤ 1 dødsfald) eller C (ingen toksicitet) vil medføre, at stoffet ikke skal klassificeres i henhold til GHS. Tilsvarende gælder, at hvis der anvendes en anden startdosis end 5 000 mg/kg, vil forsøget blive udvidet til 5 000 mg/kg i tilfælde af udfald C ved 2 000 mg/kg; et efterfølgende udfald A ved 5 000 mg/kg vil placere stoffet i GHS kategori 5, mens udfald B eller C vil medføre, at stoffet ikke skal klassificeres.

*BILAGÂ 4*

**TESTMETODE B.l a**

**Vejledning i klassificering efter EU-systemet i overgangsperioden indtil fuld gennemfÃ‚relse af det globale harmoniserede klassifikationssystem (GHS) (fra henvisning (8))**




Startdosis: 300 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg*
A
B
C
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Startdosis: 2000 mg/kg
START
5 dyr
5 mg/kg
5 dyr
50 mg/kg
5 dyr
300 mg/kg
5 dyr
2000 mg/kg
EU-klassificering
T+
T+
T+
T
T
H
H
U
U
Udfald
A ≥ 2 dødsfald
B ≥ 1 med synlig toksicitet og/eller 1 dødsfald
C Ingen synlig toksicitet og ingen dødsfald
T+ = Meget giftig
T = Giftig
H = Sundsskadelig
U = Ingen klassificering
Gruppestørrelse
De 5 dyr i hver gruppe i hovedundersøgelsen skal indbefatte eventuelle dyr, som er testet ved samme dosisniveau i forundersøgelsen.
* Tilsidesættelse af dyrevelfærd
Hvis dette dosisniveau medførte dødsfald i forundersøgelsen, skal der ikke testes flere dyr. Gå direkte til udfald A

▼B

B.1.B. **AKUT ORAL TOKSICITET — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN**

1. **METODE**

Metoden svarer til OECD TG 423 (2001).

1.1. INDLEDNING

Akut toksisitetsklassemetoden (1) er en trinvis metode, hvor der anvendes tre dyr af samme køn på hvert trin. Afhængigt af dyrenes dødelighed og/eller moribunde tilstand kræves i gennemsnit 2-4 trin til vurdering af den akutte toksicitet af et teststof. Metoden er reproducerbar, kræver meget få dyr og gør det muligt at vurdere stofferne efter giftighed på tilsvarende måde som andre metoder til bestemmelse af akut toksicitet. Akut toksicitetsklassemetoden bygger på biometriske vurderinger (2)(3)(4)(5) med faste doser, der er spredt således, at et stofs giftighed kan bestemmes med henblik på klassificering og risikovurdering, Metoden blev indført i 1996 og er blevet grundigt valideret in vivo over for $LD_{50}$-data fra litteraturen, både nationalt (6) og internationalt (7).

Vejledning i valg af den mest hensigtsmæssige forsøgsmetode til et givet formål kan findes i Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). Samme dokument indeholder desuden supplerende oplysninger om udførelse og fortolkning af forsøg efter metode B.1.B.

Man behøver ikke indgive stofferne i doser, der vides at medføre udtalt smerte og lidelse på grund af ætsende eller stærkt irriterende virkning. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant og betragtes ved fortolkningen af forsøgsresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under forsøget. Kriterierne for aflivning af moribunde eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (9).

Metoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at vurdere stofferne efter giftighed og klassificere stofferne efter det globale harmoniserede system (GHS) til klassificering af kemiske stoffer med akut toksisk virkning (10).

I princippet er metoden ikke beregnet til bestemmelse af en nøjagtig $LD_{50}$-værdi, men giver mulighed for at fastlægge nogle eksponeringsintervaller, inden for hvilke der forventes dødelighed, idet død af en del af dyrene fortsat er testens vigtigste effektparameter. For at en $LD_{50}$-værdi kan bestemmes med metoden, skal mindst to dosisniveaer resultere i større dødelighed end 0 % og lavere end 100 %. Ved at benytte en række på forhånd fastlagte doser, uafhængigt af teststoffet, og ved eksplicit at basere klassifikationen på antal dyr, der observeres i forskellige tilstande, får laboratoriet bedre mulighed for at opnå sammenhængende og repeterbare resultater.

▼B

Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo og in vitro toksicitetsundersøgelser af stoffet, toksikologiske data for strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige, for at det til alle parters tilfredshed kan godtgøres, at forsøget har betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af den bedst egnede startdosis.

1.2. DEFINITIONER

**Akut oral toksicitet:** de sundhedsmæssigt uønskede virkninger, som optræder efter oral indgift af en enkelt dosis af et stof eller efter flere doser indgivet i løbet af 24 timer.

**Forsinket død:** det forhold, at dyret ikke inden for 48 timer dør eller fremtræder moribund, men dør senere inden for den 14 dage lange observationsperiode.

**Dosis:** den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg).

**GHS:** Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures. Et tælles projekt mellem OECD (sundhed og miljø), FN's ekspertudvalg vedrørende transport af farligt gods (fysisk-kemiske egenskaber) og ILO (faremærkning og -angivelse) koordineret af Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

**Overhængende død:** det forhold, at moribund tilstand eller død forventes at indtræffe inden næste planlagte observationstidspunkt. Som tegn på denne tilstand i gnavere kan nævnes kramper, sideleje, liggende stilling og tremor (Se nærmere i Humane End point Guidance Document (9)).

**$LD_{50}$ (middel oral letaldosis):** den statistisk beregnede enkeltdosis af et teststof, som ved oral indgift kan forventes at medføre døden hos 50 % af dyrene. $LD_{50}$-værdien angives som vægtmængde teststof pr. vægtenhed kropsvægt af forsøgsdyret (mg/kg).

**Grænsedosis:** en dosis, som danner øvre grænse for testen (2 000 eller 5 000 mg/kg).

**Moribund tilstand:** en tilstand, hvor dyret er døende eller ikke vil overleve, selv om det behandles (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (9)).

**Forudsigelig død:** tilstedeværelse af kliniske tegn. Som antyder, at døden vil indtræffe på et kendt tidspunkt før forsøgets planlagte afslutning; f.eks. at dyret er ude af stand til at bevæge sig hen til vand eller føde (se nærmere i Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Metoden bygger på en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes det mindst mulige antal dyr, og man opnår tilstrækkelig information om teststoffets akutte giftighed til, at det kan klassificeres. Stoffet gives oralt til en gruppe forsøgsdyr ved en af de fastlagte doser. Stoffet testes ved en trinvis fremgangsmåde, hvor der på hvert trin anvendes tre dyr af samme køn (normalt hunner). Stofrelateret dødelighed (eller fravær heraf) af de behandlede dyr på det ene trin bestemmer næste trin, dvs.:

— ingen yderligere testning nødvendig

— dosering af yderligere tre dyr med samme dosis

— dosering af yderligere tre dyr på næste højere eller lavere dosisniveau.

Detaljer vedrørende testmetoden er beskrevet i bilag 1. Metoden giver mulighed for vurdering af stoffets klassificering i en af de toksicitetsklasser, der er bestemt ved fast afgrænsede $LD_{50}$-værdier.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, men andre gnaverarter kan anvendes. Sædvanligvis anvendes hundyr (9). Baggrunden herfor er, at litteraturundersøgelser af konventionelle $LD_{50}$-forsøg viser, at de to køn sædvanligvis ikke udviser stor forskel i følsomhed, men hvis der er forskel, er hundyr sædvanligvis lidt mere følsomme end handyr (11). Foreligger der imidlertid for strukturelt beslægtede stoffer toksikologiske eller toksikokinetiske oplysninger, som tyder på, at hanner må forventes at være mere følsomme end hunner, bør handyr anvendes. Udføres forsøget i hanner, skal fyldestgørende begrundelse herfor gives.

Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvert dyr skal ved doseringens begyndelse være mellem 8 og 12 uger gammelt, og dets vægt afvige højst ± 20 % fra gennemsnitsvægten af eventuelle tidligere doserede dyr.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke være over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Dyrene i en given dosisgruppe kan være anbragt i samme bur, men antallet af dyr i buret må ikke vanskeliggøre observation af de enkelte dyr.

▼B

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst 5 døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

1.4.4. **Tilberedning af doser**

Sædvanligvis anvendes samme volumen til indgift af teststoffet på alle de anvendte dosisniveauer, idet man varierer koncentrationen i det indgivne præparat. Er det færdige produkt eller den færdige blanding flydende, kan anvendelse af ufortyndet teststof, dvs. med konstant koncentration, være mest relevant for den efterfølgende risikovurdering af stoffet, og af nogle myndigheder stilles da også krav herom. I begge tilfælde må det maksimale volumen for indgift ikke overskrides. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse. Til gnavere må rumfanget normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt. ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende 2 ml/100 g kropsvægt. Ved formulering af doseringspræparatet anbefales det så vidt muligt at benytte en vandig opløsning/suspension/emulsion, efterfulgt (i prioriteret rækkefølge) af en opløsning/suspension/emulsion i olie (f.eks. majsolie) og derefter eventuelt en opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Doserne skal tilberedes kort før indgift, medmindre præparatets holdbarhed inden for anvendelsesperioden kendes og er godtgjort at være tilfredsstillende.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Administration of doserne**

Teststoffet indgives ved gavage som én enkelt dosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Er det ikke muligt at indgive den pågældende stofmængde som en enkelt dosis, kan den undtagelsesvis undtagelsesvis indgives opdelt i få enkelte dele af den samlede dosis over en periode på højst 24 timer.

Dyrene skal være fastende inden doseringen (f.eks. skal rotter natten over ikke have foder, men adgang til vand. mus skal i 3-4 timer ikke have foder, men adgang til vand). Efter fasteperioden vejes dyrene, og teststoffet indgives, Når stoffet er indgivet, kan dyrene unddrages føde i yderligere 3-4 timer for rotter og 1-2 timer for mus. Når en dosis indgives delt over et vist tidsrum, kan det alt efter dette tidsrum være nødvendigt at give dyrene foder og adgang til vand.

1.5.2. **Antal dyr og dosisniveauer**

Der anvendes tre dyr til hvert trin. Som startdosis anvendes et af fire faste niveauer, 5, 50, 300 og 2 000 mg/kg kropsvægt. Som startdosis skal anvendes den, der med størst sandsynlighed forventes at fremkalde dødelighed i nogle af de doserede dyr. I skemaerne i bilag 1 beskrives den procedure, der skal følges for hver startdosis. Derudover giver bilag 4 vejledning i, hvordan man foretager klassificeringen i EU's system, indtil det nye GHS er indført.

▼B

Når de foreliggende oplysninger tyder på, at der næppe kan forventes dødelighed ved den højeste startdosis (2 000 mg/kg kropsvægt), skal der udføres en grænsetest. Når der ikke foreligger nogen oplysninger om teststoffet, anbefales 300 mg/kg kropsvægt som startdosis af dyrevelfærdsmæssige grunde.

Tidsintervallet mellem doseringerne på hvert niveau bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Behandlingen af dyrene ved næste dosering skal vente, indtil det er sikkert, at de tidligere doserede dyr vil overleve.

Undtagelsesvis, og kun når det kan begrundes konkret ud fra myndighedsregler, kan det overvejes at anvende et supplerende højeste fast dosisniveau på 5 000 mg/kg (se bilag 2), Af dyrevelfærdsmæssige grunde anbefales det at undgå testning i området svarende til GHS-kategori 5 (2 000-5 000 mg/kg), som kun bør overvejes, når resultaterne af et sådant forsøg med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed eller miljøet.

1.5.3. **Grænsetest**

Grænsetesten anvendes fortrinsvis i situationer, hvor forsøgslederen har oplysninger om, at teststoffet må forventes at være atoksisk, dvs. kun er toksisk i doser over de grænsedoser, der er fastsat i bestemmelserne. Oplysninger om teststoffets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller tilsvarende testede blandinger eller produkter, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om teststoffets toksicitet, eller når stoffet forventes at være toksisk, bør hovedundersøgelsen udføres.

Der kan udføres en grænsetest ved ét dosisniveau på 2 000 mg/kg kropsvægt med seks dyr (tre dyr på hvert trin). Undtagelsesvis kan der i grænsetesten anvendes et dosisniveau på 5 000 mg/kg kropsvægt med tre dyr (se bilag 2). Hvis dette medfører teststofrelateret mortalitet, kan yderligere testning på næste lavere dosisniveau være nødvendig.

1.6 OBSERVATIONER

Efter doseringen iagttages dyrene enkeltvis mindst én gang i de første 30 minutter, og periodisk de første 24 timer, under særlig opmærksomhed de første 4 timer, derefter dagligt, gennem i alt 14 dage, bortset fra tilfælde, hvor dyrene må tages ud af undersøgelsen og aflives humant af dyrevelfærdsmæssige grunde eller findes døde. Imidlertid bør observationsperioden ikke fastsættes ufravigeligt. Den fastlægges ud fra de toksiske reaktioners indsætten og restitutionsperiodens længde og kan således forlænges, når det skønnes nødvendigt. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer (12). Alle observationer registreres systematisk i og der føres individuel protokol for hvert dyr.

▼B

Viser dyrene fortsat tegn på toksicitet, vil supplerende observationer være nødvendige, Observationerne skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonome nervesystem og centralnervesystem, samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og coma. Ligeledes skal der tages hensyn til principperne og kriterierne i Humane Endpoints Guidance Document (9). Dyr, som findes at være moribunde, og dyr, som udviser svære smerter eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

1.6.1. **Kropsvægt**

Vægten af hvert enkelt dyr bestemmes kort før indgift af teststoffet og derefter mindst én gang om ugen. Vægtændringer beregnes og registreres. Ved forsøgets slutning vejes de overlevende dyr, som derefter aflives humant.

1.6.2. **Patologi**

Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk undersøgelse. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr. Endvidere kan det overvejes at foretage mikroskopisk undersøgelse af organer, som udviser makroskopiske forandringer, da dette kan give nyttige oplysninger.

2. **DATA**

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover opstilles i tabelform for hver forsøgsgruppe antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet, samt obduktionsfund.

3. **RAPPORTERING**

3.1. **Forsøgsrapport**

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

For teststoffet:

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsdata, herunder CAS-nummer.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

▼B

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— dyrenes antal, alder og køn (og, i givet fald, begrundelse for brug af handyr i stedet for hundyr)

— oprindelse, opstaldning, foder osv.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende teststoffets formulering, herunder beskrivelse af det indgivne materiales fysiske tilstand;

— oplysninger om administrationen af teststoffet, herunder doseringsvolumen og doseringstidspunkt:

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder foderets art og oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valg af startdosis.

Resultater:

— opstilling i tabelform af effekter og dosisniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet; og virkningernes art, sværhed og varighed)

— opstilling i tabelform af kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— de enkelte dyrs vægt på doseringsdagen, derefter med én uges mellemrum, samt på døds- eller aflivningstidspunktet

— dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før den planlagte aflivning

— for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr, obduktionsfund og, i givet fald, histopatologiske fund.

Diskussion og fartolkning af resultater.

Konklusioner.

4. **HENVISNINGER**

(1) Roll R., Hiifer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschlager M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität van Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to $LD/LC_{50}$ Tests. ALTEX 16, 129-134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Tosic- Class Method — An Alternative to the $LD_{50}$ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R.L, Cotnivo. J.A, Hill R.N., Bruce R.D., Stitzel K.A., Walter A.P. Chu I: Goddard M, Segal L., Springer J.A. and Myers R.C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles und Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd, New York, USA.

▼B

*BILAG 1*

**FREMGANGSMÅDE, SOM SKAL FØLGES FOR HVER STARTDOSIS**

*GENERELLE BEMÆRKNINGER*

For hver startdosis er anvist korrekt fremgangsmåde i den pågældende forsøgsplan i dette bilag.

— Bilag 1 A: Startdosis er 5 mg/kg kropsvægt

— Bilag 1 B: Startdosis er 50 mg/kg kropsvægt

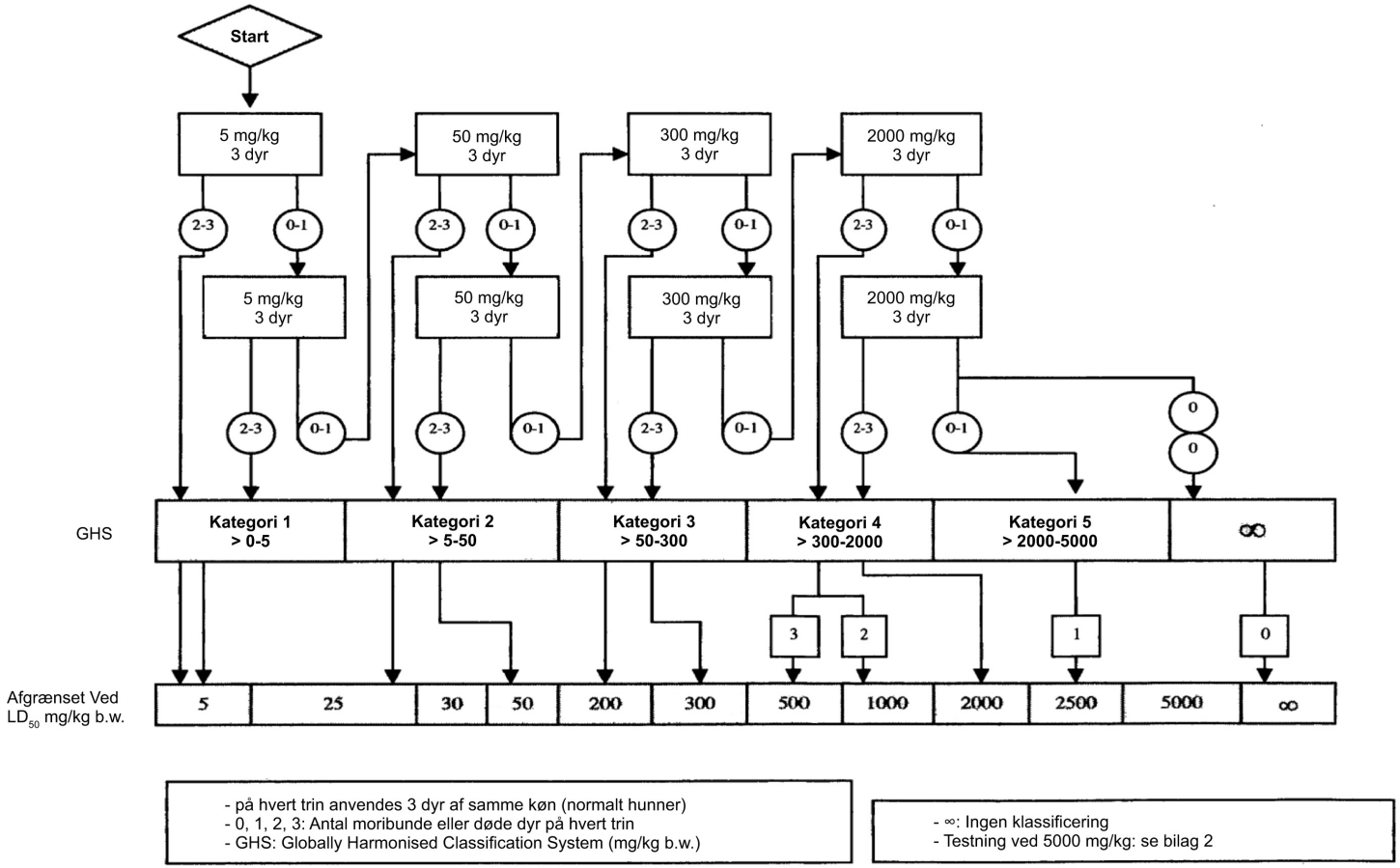
— Bilag 1 C: Startdosis er 300 mg/kg kropsvægt

— Bilag 1 D: Startdosis er 2 000 mg/kg kropsvægt

Ved forsøgsgangen følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

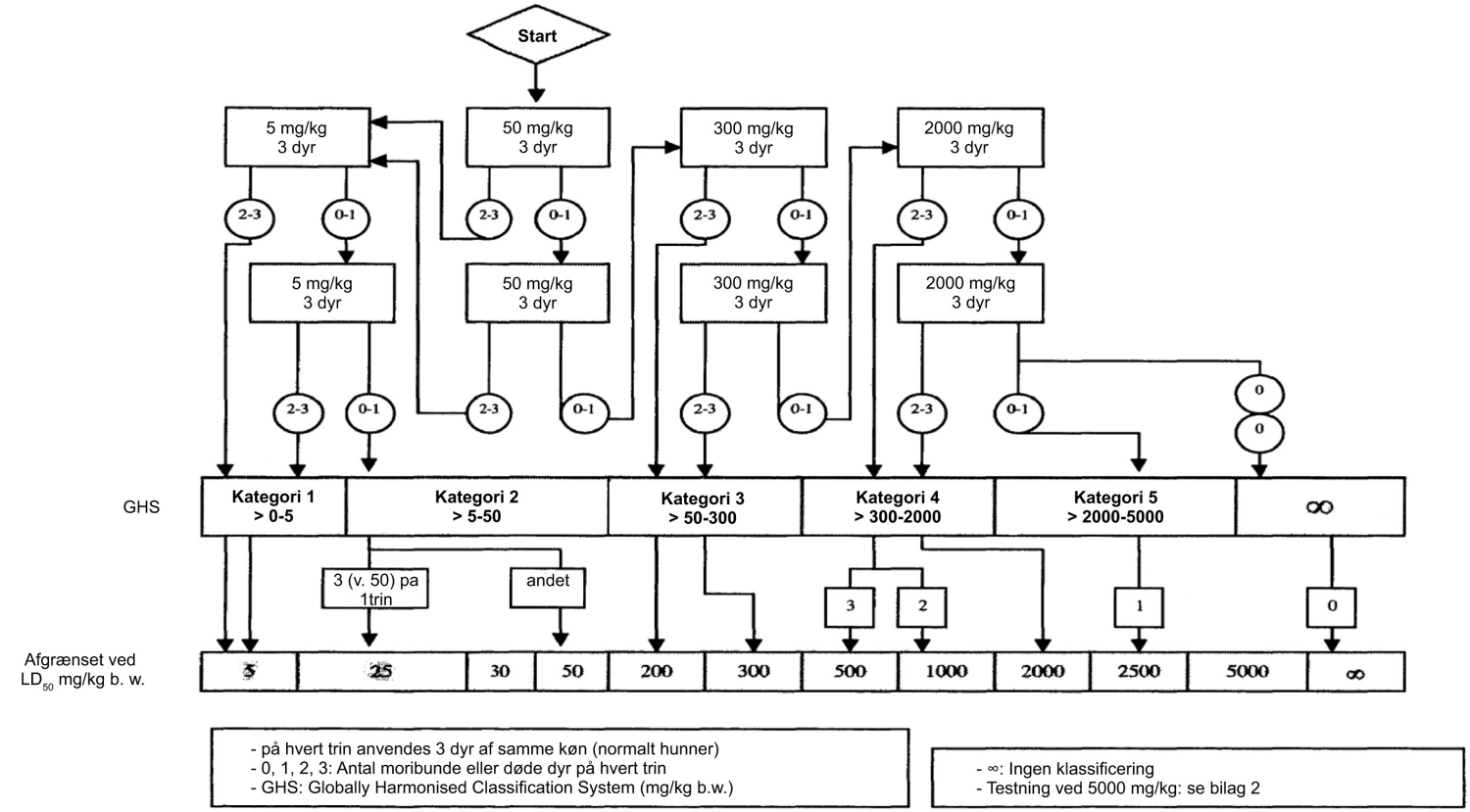
*BILAG I A*

**FREMGANGSMÅDE VED ANVENDELSE AF EN STARTDOSIS PÅ 5 MG/KG KROPSV ÆGT**



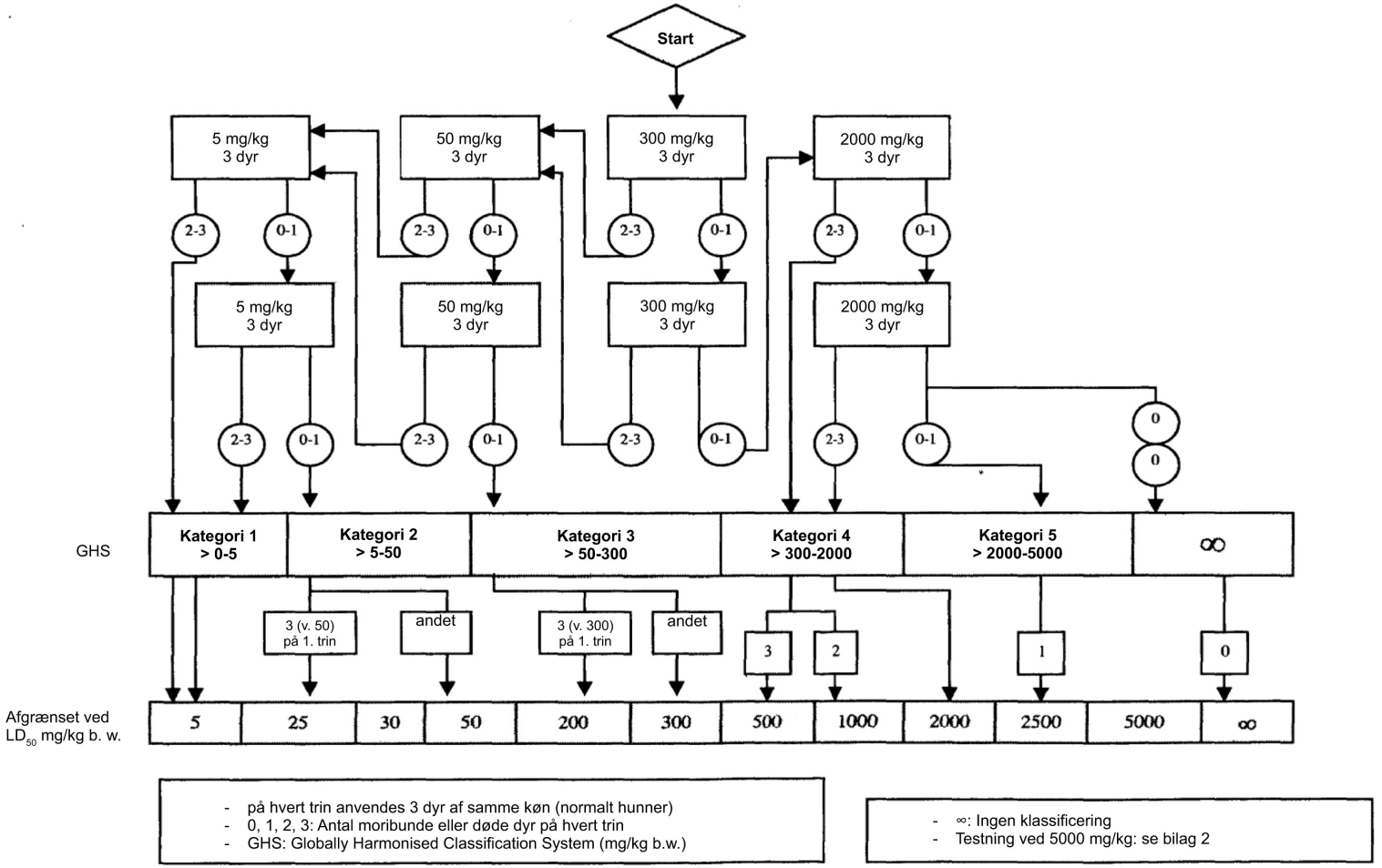
*BILAG 1 B*

## FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 50 MG/KG KROPSVÆGT



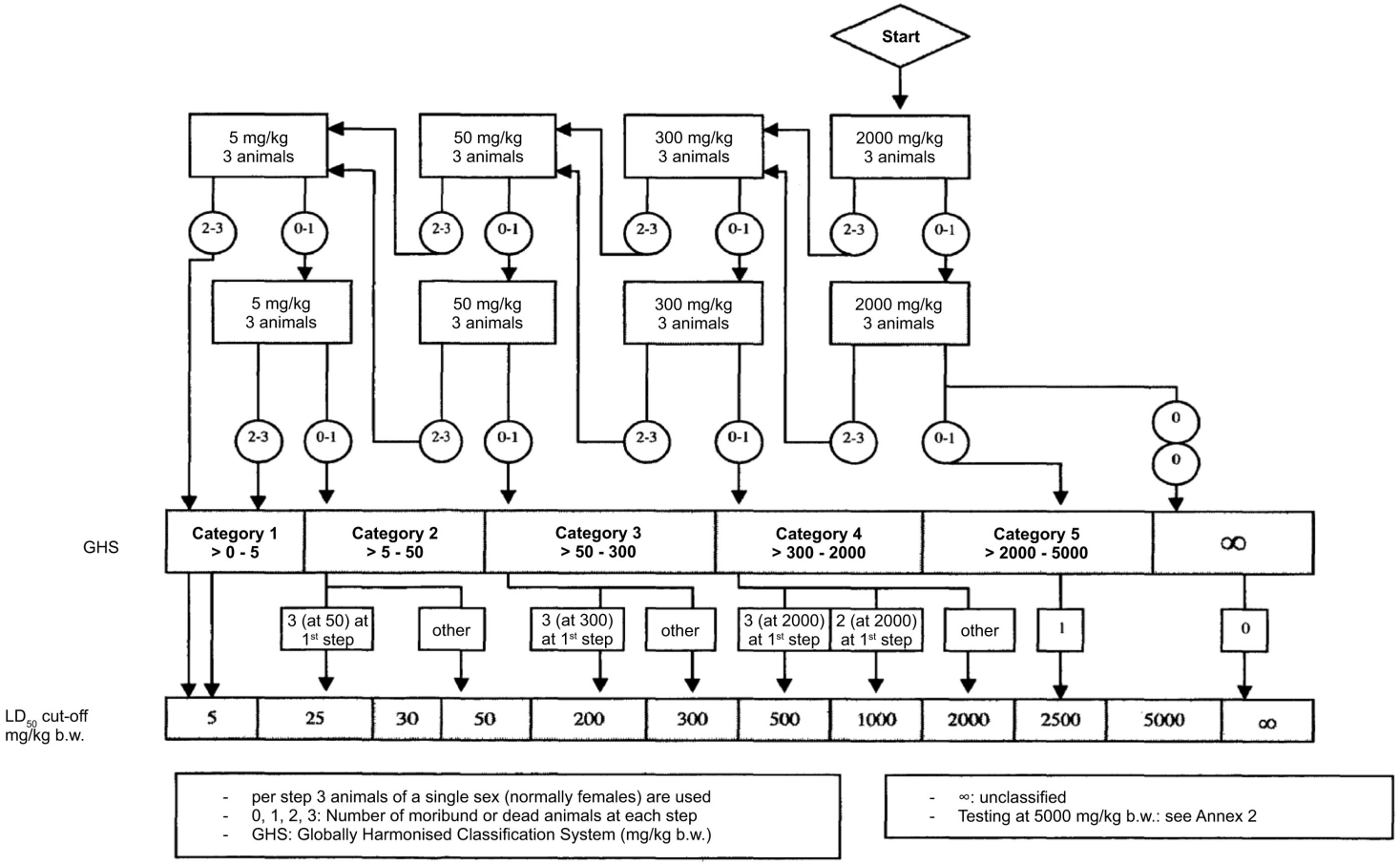
*BILAG 1 C*

## FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 300 MG/KG KROPSVÆGT



*BILAG 1 D*

**FREMGANGSMÅDE VED EN STARTDOSIS PÅ 2 000 MG/KG KROPSVÆGT**



▼B

*BILAG 2*

## KRITERIER FOR KLASSIFICERING AF TESTSTOFFER MED FORVENTET $LD_{50}$ OVER 2 000 MG/KG UDENAT TESTNING ER NØDVENDIG

Kriterierne for farekategori 5 skal gøre det muligt at udpege teststoffer, som udviser relativ lav risiko for akut giftighed, men som under visse omstændigheder kan udgøre en fare for følsomme populationer. For disse stoffer forventes en oral eller dermal $LD_{50}$ i området 2 000-5 000 mg/kg, eller tilsvarende doser for andre administrationsveje. i følgende tilfælde skal et teststof klassificeres i farekategorien defineret ved: 2 000 mg/kg < $LD_{50}$ < 5 000 mg/kg (kategori 5 i GHS):

a) Hvis de hører hjemme i denne kategori i henhold til enhver af testskemaerne i bilag l A-l D på grundlag af dødsfrekvensen

b) hvis foreliggende pålidelige oplysninger viser, at $LD_{50}$ ligger i området svarende til kategori 5, eller hvis andredyreundersøgelser eller toksiske virkninger i mennesker viser, at der er grund til alvorlige sundhedsmæssige betænkeligheder

c) ved ekstrapolation, skønsmæssig ansættelse eller måling af data. når der ikke er grundlag for at tilordne stoffet til en farligere klasse, og

   — foreliggende pålidelige oplysninger viser betydelig toksisk virkning på mennesker, eller

   — der iagttages dødelighed ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 ved oral indgift, eller

   — ekspertvurderinger bekræfter, at der ved testning op til værdierne svarende til kategori 4 findes væsentlige kliniske tegn på toksicitet, bortset fra diarré, pilorektion eller uplejet udseende af pels. eller

   — ekspertvurderinger bekræfter pålidelige oplysninger om potentiale for væsentlige akutte virkninger i de andre dyreforsøg.

## TESTNING VED DOSER OVER 2 000 MG/KG

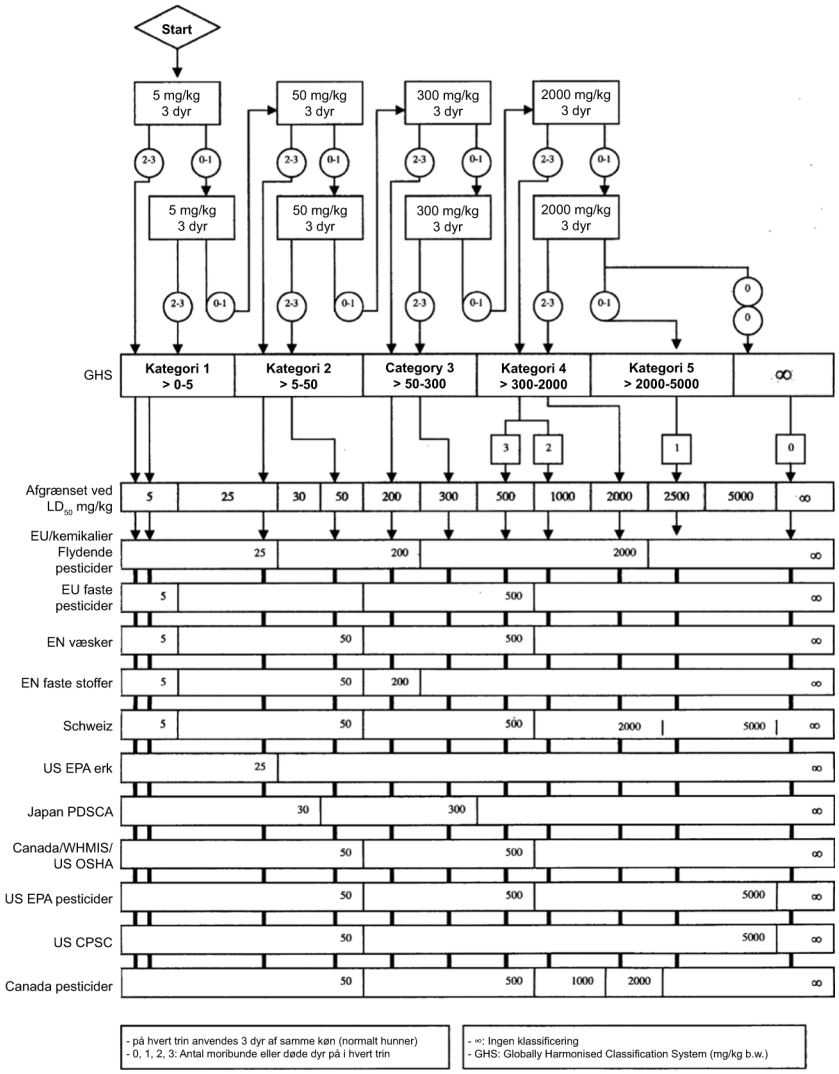
Dyrevelfærdsmæssige hensyn taler imod testning i området 5 000 mg/kg i kategori 5 (5 000 mg/kg), og et sådant forsøg bør kun overvejes, når dets resultater med overvejende sandsynlighed må forventes at få direkte relevans for beskyttelsen af dyrs eller menneskers sundhed eller miljøet (10). Der bør ikke udføres yderligere forsøg ved højere dosisniveauer.

Er testning ved 5 000 mg/kg nødvendig, kræves kun ét trin (dvs. tre dyr). Hvis det først doserede dyr dør, fortsættes testningen ved 2 000 mg/kg efter skemaerne i bilag 1. Overlever det første dyr, doseres to dyr mere. Hvis kun ét af de tre dyr dør, er den forventede $LD_{50}$-værdi over 5 000 mg/kg. Hvis begge dyr dør, fortsætter doseringen ved 2 000 mg/kg.

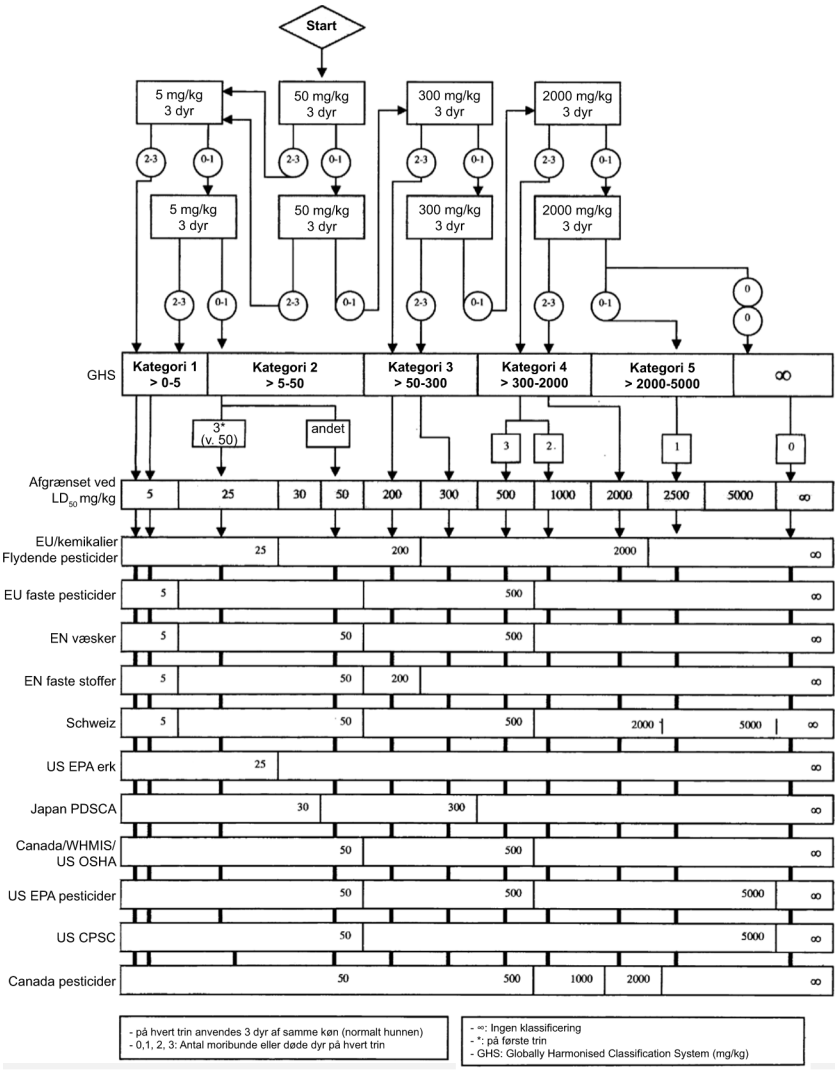
▼B

*BILAG 3*

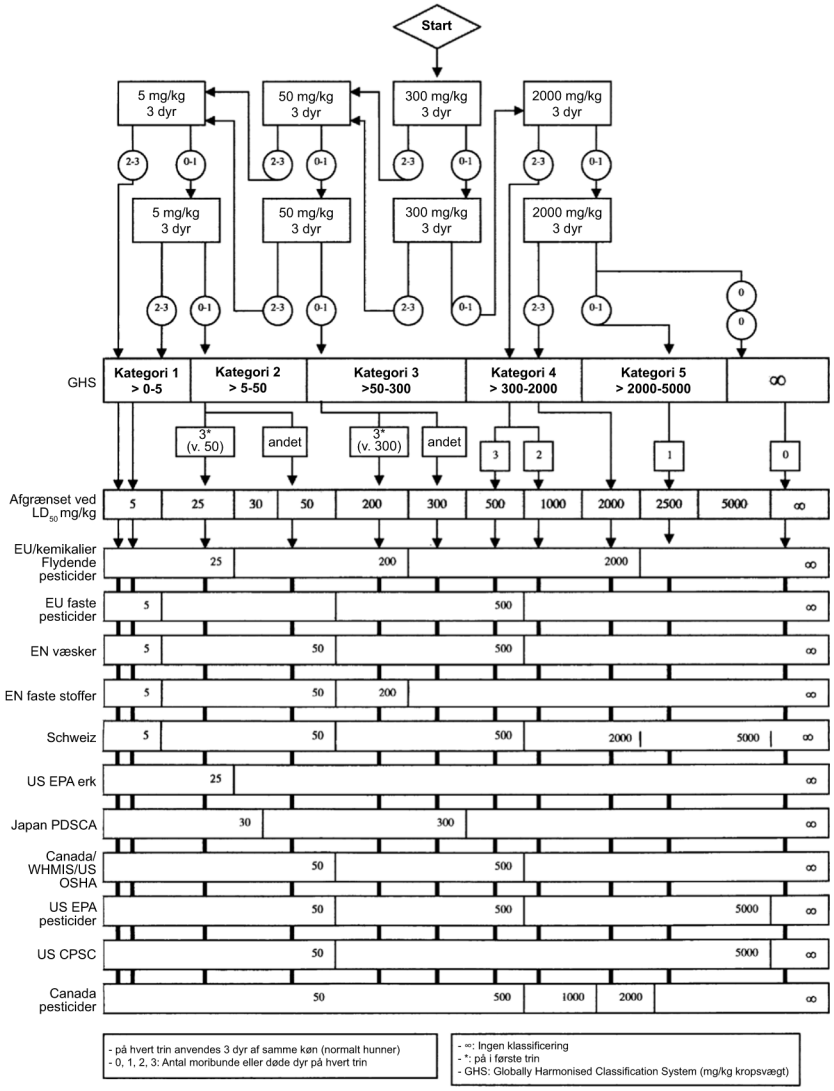
**TESTMETODE B.1 b. Vejledning i klassificering efter EU-systemet i overgangsperioden indtil fuld gennemførelse af det globale harmoniserede klassifikationssystem (GHS) (fra henvisning (8))**



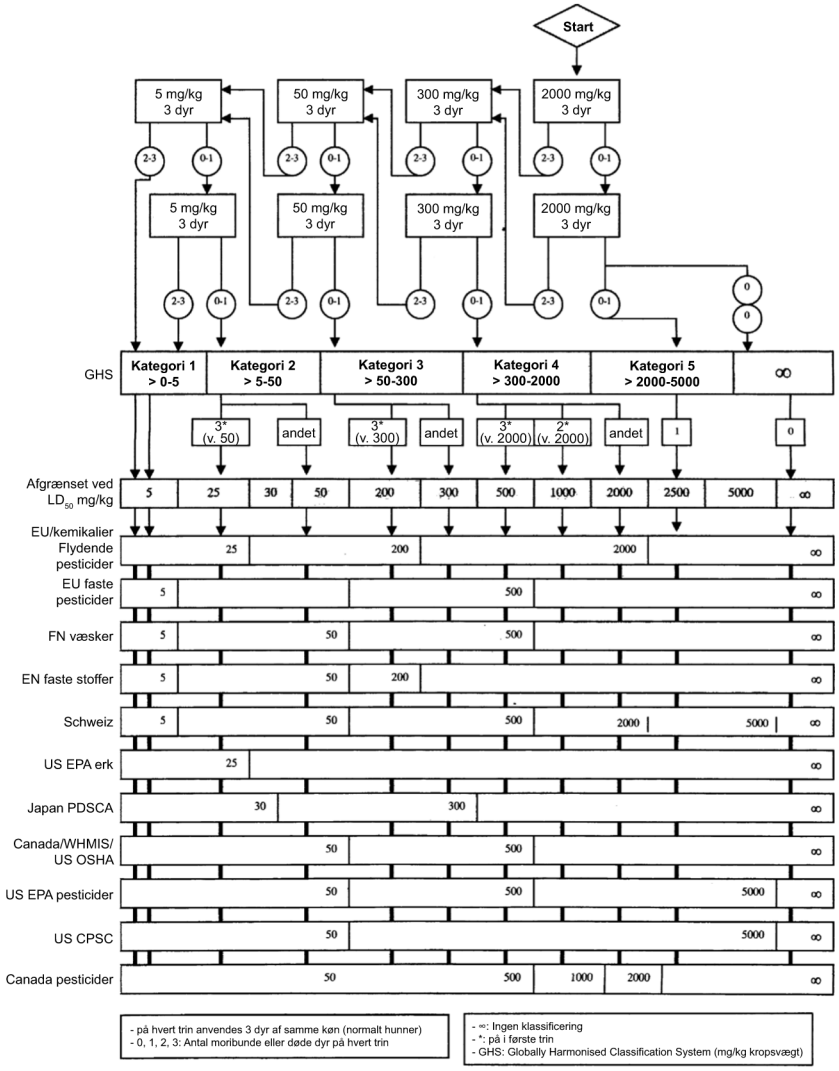
▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 > 50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
Afgrænset ved LD50 mg/kg
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/kemikalier Flydende pesticider
EU faste pesticider
EN væsker
EN faste stoffer
Schweiz
US EPA erk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticider
US CPSC
Canada pesticider
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunnen)
- 0,1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- ∞: Ingen klassificering
- *: på første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 >50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
3* (v. 300)
andet
3
2
1
0
Afgrænset ved LD50 mg/kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalier Flydende pesticider
25 200 2000 ∞
EU faste pesticider
5 500 ∞
EN væsker
5 50 500 ∞
EN faste stoffer
5 50 200 ∞
Schweiz
5 50 500 2000 5000 ∞
US EPA erk
25 ∞
Japan PDSCA
30 300 ∞
Canada/ WHMIS/US OSHA
50 500 ∞
US EPA pesticider
50 500 5000 ∞
US CPSC
50 5000 ∞
Canada pesticider
50 500 1000 2000 ∞
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunner)
- 0, 1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- ∞: Ingen klassificering
- *: på i første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg kropsvægt)

▼B


Start
5 mg/kg 3 dyr
50 mg/kg 3 dyr
300 mg/kg 3 dyr
2000 mg/kg 3 dyr
2-3
0-1
0
GHS
Kategori 1 > 0-5
Kategori 2 > 5-50
Kategori 3 > 50-300
Kategori 4 > 300-2000
Kategori 5 > 2000-5000
∞
3* (v. 50)
andet
3* (v. 300)
3* (v. 2000)
2* (v. 2000)
1
Afgrænset ved LD50 mg/kg
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/kemikalier Flydende pesticider
EU faste pesticider
FN væsker
EN faste stoffer
Schweiz
US EPA erk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticider
US CPSC
Canada pesticider
- på hvert trin anvendes 3 dyr af samme køn (normalt hunner)
- 0, 1, 2, 3: Antal moribunde eller døde dyr på hvert trin
- =: Ingen klassificering
- *: på i første trin
- GHS: Globally Harmonised Classification System (mg/kg kropsvægt)

▼M4

## B.2. AKUT TOKSICITET (INHALATION)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 403 (2009) (1). Den oprindelige Test Guideline 403 (TG 403) for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981. Formålet med denne reviderede testmetode B.2 (som svarer til den reviderede TG 403) er at sikre mere fleksibilitet, reducere omfanget af dyreforsøg og opfylde myndighedsbestemmelser. Den reviderede testmetode omfatter to typer forsøg: en traditionel $LC_{50}$-protokol og en koncentration × tid-protokol (C × t). Denne testmetode er primært kendetegnet ved dens evne til at tilvejebringe en koncentrationsresponsrelation varierede fra ikke-dødelige til dødelige resultater med henblik på at få en gennemsnitlig dødelig dosis ($LC_{50}$), ikke-dødelig tærskelkoncentration (f.eks. $LC_{01}$) og hældning og dens evne til at identificere mulig kønsspecifik modtagelighed. C × t-protokollen bør anvendes, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab [f.eks. udledning af værdier for Acute Exposure Guideline Levels (AEGL), Emergency Response Planning Guidelines (ERPG) eller Acute Exposure Threshold Levels (AETL)] eller med henblik på fysisk planlægning.

2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39) (2).

3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i GD 39 (2).

4. Denne testmetode muliggør karakterisering og kvantitativ risikovurdering af testkemikaliet og gør det muligt at vurdere og klassificere testkemikalierne i overensstemmelse med forordning (EF) nr. 1272/2008 (3). GD 39 (2) beskriver, hvordan den mest hensigtsmæssige metode til akut testning vælges. Hvis der kun kræves oplysninger om klassificering og mærkning, anbefales generelt kapitel B.52 i dette bilag (4) [se GD 39 (2)]. Denne testmetode B.2 er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet, herunder eksisterende forsøg (f.eks. kapitel B.52 i dette bilag (4)), hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer [se GD 39 (2)].

▼M4

6. Test af ætsende og/eller irriterende testkemikalier ved koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, bør så vidt muligt undgås. Ætsnings-/irritationsstyrken skal evalueres af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr (f.eks. fra forsøg med gentagen dosering udført ved koncentrationer, der ikke er ætsende/irriterende), eksisterende in vitro-data [f.eks. fra kapitel B.40 (5) og kapitel B.40.A (6) i dette bilag eller OECD TG 435 (7)], pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data med henblik på at undersøge, om yderligere test kan undgås. Når konkrete myndighedsbestemmelser gør det nødvendigt (f.eks. i forbindelse med planlægning af nødberedskab), kan denne testmetode bruges til eksponering af dyr for sådanne materialer, fordi det giver forsøgslederen eller den primære investigator mulighed for at vælge målkoncentrationerne. Målkoncentrationerne bør dog ikke have svære irriterende/ætsende virkninger, men alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i hvert enkelt tilfælde, og den valgte koncentration bør begrundes [se GD 39 (2)].

TESTENS PRINCIP

7. Denne reviderede testmetode B.2 har til formål at tilvejebringe tilstrækkelige oplysninger om den akutte toksicitet af et testkemikalie til, at det kan klassificeres, og til at tilvejebringe data om dødelighed (f.eks. $LC_{50}$, $LC_{01}$ og hældning) for et eller begge køn, hvis det er nødvendigt til de kvantitative risikovurderinger. Denne testmetode omfatter to metoder. Den første metode er en traditionel protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekoncentration (grænsetest) eller en serie af koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde i en forudbestemt periode på normalt fire timer. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. Den anden metode er en C × t-protokol, hvor grupper af dyr eksponeres for en grænsekoncentration eller en serie af flere koncentrationer i flere perioder.

8. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humant og betragtes ved fortolkningen af testresultatet på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (8).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

9. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

**Forberedelse af dyrene**

10. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnes også testudstyret i en kort perioden inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

▼M4

**Dyreopdræt og -sundhed**

11. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

**Inhalationskamre**

12. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med forsøget kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i forsøgsrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

EKSPONERINGSBETINGELSER

**Administration af koncentrationer**

13. Eksponering gennem næsen kan være af enhver varighed på op til seks timer for rotter. Hvis mus eksponeres gennem næsen, må eksponeringstiden generelt ikke overstige fire timer. Der gives en begrundelse, hvis test af længere varighed er påkrævet [se GD 39 (2)]. Dyr, der eksponeres for aerosoler i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliet som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

14. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

▼M4

**Partikelstørrelsesfordeling**

15. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 μm med en geometrisk standardafvigelse ($\sigma_g$) i området fra 1,5 til 3,0 (2) (9) (10). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroskopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

**Fremstilling af testkemikalie i vehikel**

16. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliet ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliets sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliet skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable stoffer, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

**Kontroldyr**

17. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

**Luftgennemstrømning i kammer**

18. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (2) (11). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

▼M4

**Kammerets temperatur og relative fugtighed**

19. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

**Testkemikalie: nominel koncentration**

20. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

**Testkemikalie: faktisk koncentration**

21. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før forsøget. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.

22. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

23. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør der anvendes fire prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra

▼M4

middelkoncentrationen med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer ($t_{95}$) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå $t_{95}$. Vejledning i beregning af $t_{95}$ findes i GD 39 (2).

24. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

**Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling**

25. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 15).

FREMGANGSMÅDE

26. To forsøgstyper er beskrevet nedenfor: en traditionel protokol og en C × t-protokol. Begge protokoller kan omfatte et forforsøg, et hovedforsøg og/eller en grænsetest (traditionel protokol) eller testning ved en grænsekoncentration (C × t). Hvis et køn vides at være mere modtagelig, kan forsøgslederen vælge at udføre disse forsøg alene ved hjælp af det mest modtagelige køn. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Inden forsøget påbegyndes, undersøges alle tilgængelige data med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Data, der er indhentet ved hjælp af kapitel B.52 i dette bilag 4, kan f.eks. overflødiggøre behovet for et forforsøg og kan også vise, om et køn er mere modtageligt [se GD 39 (2)].

▼M4

TRADITIONEL PROTOKOL

**Generelle betragtninger: Traditionel protokol**

27. I et traditionelt forsøg eksponeres grupper af dyr for et testkemikalie i en bestemt tidsperiode (oftest 4 timer) i et kammer til eksponering gennem næsen eller helkropseksponering. Dyr eksponeres for en grænsekoncentration (grænsetest) eller mindst tre koncentrationer i en trinvis fremgangsmåde (hovedforsøg). Et forforsøg kan udføres inden hovedforsøget, medmindre der allerede foreligger visse informationer om testkemikaliet, f.eks. et tidligere udført B.52-forsøg [se GD 39 (2)].

**Forforsøg: traditionel protokol**

28. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliets styrke, identificere kønsbetingede forskelle i modtagelighed og hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget eller grænsetesten. Når koncentrationerne vælges til forforsøget, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder tilgængelige (Q)SAR-data og data vedrørende lignende kemikalier. Højst tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hver koncentration (3 dyr/køn kan være nødvendigt for at fastslå en kønsbetinget forskel). Et forforsøg kan omfatte én koncentration, men flere koncentrationer kan om nødvendigt testes. Et forforsøg bør ikke teste så mange dyr og koncentrationer, at det ligner et hovedforsøg. Et tidligere udført B.52-forsøg (4) kan bruges i stedet for et forforsøg [se GD 39 (2)].

**Grænsetest: traditionel protokol**

29. En grænsetest bruges, når testkemikaliet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekoncentration. I en grænsetest eksponeres en gruppe af tre hanner og tre hunner for testkemikaliet ved en grænsekoncentration. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede kemikalier, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikaliets toksicitet, eller når testkemikaliet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres.

30. Valget af grænsekoncentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (MMAD på 1-4 μm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Grænsekoncentrationen bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

▼M4

31. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved grænsekoncentrationen, kan resultaterne af grænsetesten bruges som et forforsøg med henblik på yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekoncentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekoncentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikaliet muligvis genereres som en flydende aerosol.

**Hovedforsøg: traditionel protokol**

32. Et hovedforsøg udføres typisk med fem hanner og fem hunner (eller 5 dyr af det mest modtagelige køn, hvis det kendes) pr. koncentrationsniveau med mindst tre koncentrationsniveauer. Der skal bruges tilstrækkelige koncentrationsniveauer til at opnå en robust statistisk analyse. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Som følge af afhængigheden af avancerede teknologier er dette ikke altid praktisk muligt i inhalationsforsøg, og derfor bør eksponeringen af dyr ved det næste koncentrationsniveau baseres på tidligere erfaring og videnskabelig vurdering. GD 39 (2) bør anvendes ved test af blandinger.

KONCENTRATION × TID-PROTOKOL (C × T)

**Generelle betragtninger: C × t-protokol**

33. Et trinvist C × t-forsøg kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Denne fremgangsmåde gør det muligt at eksponere dyr for et testkemikalie ved flere koncentrationsniveauer og i flere tidsrum. Alle test udføres i et kammer til eksponering gennem næsen (helkropskamre er ikke anvendelige i forbindelse med denne protokol). Et flowdiagram i tillæg 1 illustrerer denne protokol. En simuleringsanalyse har vist, at den traditionelle protokol og C × t-protokollen begge kan give robuste $LC_{50}$-værdier, men C × t-protokollen er generelt bedre til at give robuste $LC_{01}$- og $LC_{10}$-værdier (15).

34. En simuleringsanalyse har vist, at det generelt er tilstrækkeligt at anvende to dyr pr. C × t-interval (et pr. køn ved brug af begge køn eller to af det mest modtagelige køn), når der testes fire koncentrationer og fem eksponeringsvarigheder i et hovedforsøg. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. C × t-interval (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration og tidspunkt, kan det reducere bias og variabiliteten af estimaterne, øge succesraten for estimeringen og forbedre konfidensintervallet. I tilfælde af utilstrækkelig tilpasning til de data, der er brugt til estimeringen (ved brug af et dyr pr. køn eller to dyr af det mest modtagelige køn), kan en femte eksponeringskoncentration også være tilstrækkelig. Yderligere vejledning om det antal dyr og koncentrationer, der skal anvendes i et C × t-forsøg, findes i GD 39 (2).

▼M4

**Forforsøg: C × t-protokol**

35. Et forforsøg bruges til at skønne testkemikaliets styrke og til at hjælpe med at vælge eksponeringskoncentrationer til hovedforsøget. Det kan være nødvendigt at udføre et forforsøg med op til tre dyr/køn/koncentration [se Appendix III i GD 39 (2)] for at vælge en hensigtsmæssig startkoncentration til hovedforsøget og minimere antallet af anvendte dyr. Der skal muligvis bruges tre dyr pr. køn for at fastslå en kønsbetinget forskel. Disse dyr bør eksponeres over én varighed, normalt 240 minutter. Muligheden for at skabe tilstrækkelige testatmosfærer bør vurderes i løbet af de tekniske forudgående test uden dyr. Det er generelt ikke nødvendigt at udføre et forforsøg, hvis mortalitetsdata er tilgængelige fra et B.52-forsøg (4). Når den indledende målkoncentration vælges i et B.2-forsøg, bør forsøgslederen overveje de mortalitetsmønstre, der er observeret i evt. tilgængelige B.52-forsøg (4) for begge køn og alle testede koncentrationer [se GD 39 (2)].

**Startkoncentration: C × t-protokol**

36. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1) er enten en grænsekoncentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Grupper af ét dyr/køn eksponeres for denne koncentration i flere tidsrum (f.eks. 15, 30, 60, 120 eller 240 minutter), så i alt 10 dyr eksponeres (kaldes eksponeringssession I) (tillæg 1).

37. Valget af grænsekoncentrationer afhænger normalt af lovgivningskrav. Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l (eller den højest opnåelige koncentration) (3). Det kan være en teknisk udfordring at generere testkoncentrationer af visse testkemikalier, især som dampe og aerosoler. Ved test af aerosoler bør målet være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. en MMAD på 1-4 μm) ved en grænsekoncentration på 2 mg/l. Dette er muligt for de fleste testkemikalier. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (2)]. I henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden (3). Test, der overstiger en grænsekoncentration, bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed (3), og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden test ved startkoncentrationen, så det sikres, at betingelserne i kammeret for denne koncentration kan opnås.

38. Hvis der observeres mortalitet eller døende tilstand ved startkoncentrationen, kan resultaterne ved denne koncentration bruges som udgangspunkt for yderligere test ved andre koncentrationer (se hovedforsøg). Hvis et testkemikalies fysiske eller kemiske egenskaber gør det umuligt at opnå en grænsekoncentration, testes den højest opnåelige koncentration. Hvis mindre end 50 % letalitet forekommer ved den højest opnåelige koncentration, er yderligere test ikke nødvendig. Hvis grænsekoncentrationen ikke kan opnås, gives en forklaring og understøttende data i forsøgsrapporten. Hvis den højest opnåelige koncentration af en damp ikke fremkalder toksicitet, skal testkemikaliet muligvis genereres som en flydende aerosol.

▼M4

**Hovedforsøg: C × t-protokol**

39. Startkoncentrationen (eksponeringssession I) (tillæg 1), som testes i hovedforsøget, er enten en grænsekoncentration eller en koncentration, som forsøgslederen har valgt ud fra forforsøget. Hvis mortalitet er blevet observeret under eller efter eksponeringssession I, bruges den minimumseksponering (C × t), der resulterer i mortalitet, som rettesnor ved bestemmelsen af koncentrationen og eksponeringsperioderne til eksponeringssession II. Hver efterfølgende eksponeringssession afhænger af den forudgående session (se tillæg 1).

40. For mange testkemikalier er de resultater, der fås ved startkoncentrationen kombineret med tre yderligere eksponeringssessioner med et mindre tidsinterval (dvs. den geometriske afstand mellem eksponeringsperioder som angivet af faktoren mellem successive perioder, generelt $\sqrt{2}$), tilstrækkelige til at bestemme C × t-mortalitetsforholdet (15), men det kan være en fordel af bruge en femte eksponeringskoncentration [se tillæg 1 og GD 39 (2)]. Oplysninger om den matematiske behandling af resultater til C × t-protokollen findes i tillæg 1.

OBSERVATIONER

41. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionsperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant af hensyn til dyrevelfærden. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikaliet, som kræver tidlig aflivning af dyrene. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Guidance Document on Humane Endpoints (GD 19), skal tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

42. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

**Kropsvægt**

43. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på ≥ 20 % sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humant ved afslutningen af perioden efter eksponering.

▼M4

**Patologi**

44. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

45. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan også omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

**Testrapport**

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

*Forsøgsdyr og pasning*

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

▼M4

*Testkemikalie*

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

*Vehikel*

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

*Inhalationskammer*

— beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret ($t_{95}$)

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

*Eksponeringsdata*

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

▼M4

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/$m^3$ osv.); volumenenheder (f.eks. ppm, ppb osv.) kan også rapporteres i parentes

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres

*Testbetingelser*

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliets sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliets sammensætning

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

*Resultater*

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og $\sigma_g$

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

— kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— estimater af letalitet (f.eks. $LC_{50}$ eller $LD_{01}$) herunder 95 % konfidensgrænser, og hældning (hvis omfattet af evalueringsmetoden)

— statistisk relation, herunder estimat af eksponenten n (C × t-protokol); navnet på den anvendte statistiske software anføres.

▼M4

*Diskussion og fortolkning af resultater*

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (8).

— Hvis test i henhold til kapitel B.52 i dette bilag (4) blev afbrudt til fordel for denne testmetode B.2, gives en begrundelse.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

*LITTERATUR:*

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

(4) Kapitel B.52 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetoden (ATC).

(5) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).

(6) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition. Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

(11) Pauluhn J og Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF og Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104. Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINITION

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

*Tillæg 1*

**C × t-protokol**

1. Et trinvist koncentration × tid-forsøg (C × t) kan overvejes som alternativ til en traditionel protokol ved vurdering af inhalationstoksicitet (12) (13) (14). Det udføres fortrinsvis, når specifikke myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør forsøg med dyr i forskellige tidsrum, f.eks. med henblik på planlægning af nødberedskab eller med henblik på fysisk planlægning. Metoden indledes normalt med test af en grænsekoncentration (eksponeringssession I), hvor dyrene eksponeres for et testkemikalie i fem perioder (f.eks. 15, 30, 60, 120 og 240 minutter), så der opnås flere varigheder inden for én eksponeringssession (se figur 1). Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. Disse koncentrationer må kun overskrides, hvis myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov nødvendiggør test ved disse koncentrationer (se afsnit 37 i kapitel B.2).

2. Hvis der foreligger begrænsede eller ingen oplysninger om toksiciteten af testkemikalie, bør der udføres et forforsøg, hvor grupper på højst tre dyr pr. køn eksponeres for de målkoncentrationer, som forsøgslederen har valgt, generelt i 240 minutter.

3. Hvis en grænsekoncentration testes i løbet af eksponeringssession I, og der observeres mindre end 50 % mortalitet, kræves der ikke yderligere testning. Hvis forholdet mellem koncentration/tid/respons skal bestemmes på højere niveauer end den angivne grænsekoncentration på grund af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov, bør den næste eksponering ske ved et højere niveau, f.eks. to gange grænsekoncentrationen (dvs. 2 L i figur 1).

4. Hvis toksicitet observeres ved grænsekoncentrationen, skal der foretages yderligere testning (hovedforsøg). Disse yderligere eksponeringer gennemføres ved lavere koncentrationer (i figur 1: Eksponeringssession II, III eller IV) eller ved højere koncentrationer i kortere tid (i figur 1: Eksponeringssession IV) i tidsrum, der er tilpasset og ikke så stor spredning.

5. Testen (startkoncentration og yderligere koncentrationer) gennemføres med ét dyr/køn pr. koncentration/tidspunkt eller med to dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt. Under visse omstændigheder kan forsøgslederen vælge at bruge to rotter pr. køn pr. koncentration/tidspunkt (eller fire dyr af det mest modtagelige køn pr. koncentration/tidspunkt) (15). Hvis der bruges to dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt, reduceres i de fleste tilfælde bias og variabiliteten af estimaterne, succesraten for estimeringen øges, og konfidensintervallet forbedres i forhold til protokollen som beskrevet her. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

6. Ideelt bør hver eksponeringssession gennemføres på én dag. Det gør det muligt at udsætte den næste eksponering, indtil der er rimelig sikkerhed for overlevelse, og det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe. Hver eksponeringssession bør indledes med den gruppe, der skal eksponeres i længst tid, f.eks. 240 minutter-eksponeringsgruppen efterfulgt af 120 minutter-eksponeringsgruppen osv. Hvis dyr i 240 minutter-gruppen f.eks. dør efter 90 minutter eller viser alvorlige tegn på toksicitet (f.eks. ekstreme forandringer i respirationsmønster, f.eks. besværet vejrtrækning), giver det ingen mening af eksponere en gruppe i 120 minutter, fordi mortaliteten sandsynligvis vil være 100 %. Forsøgslederen bør derfor vælge kortere eksponeringsvarigheder til den pågældende koncentration (f.eks. 90, 65, 45, 33 og 25 minutter).

▼M4

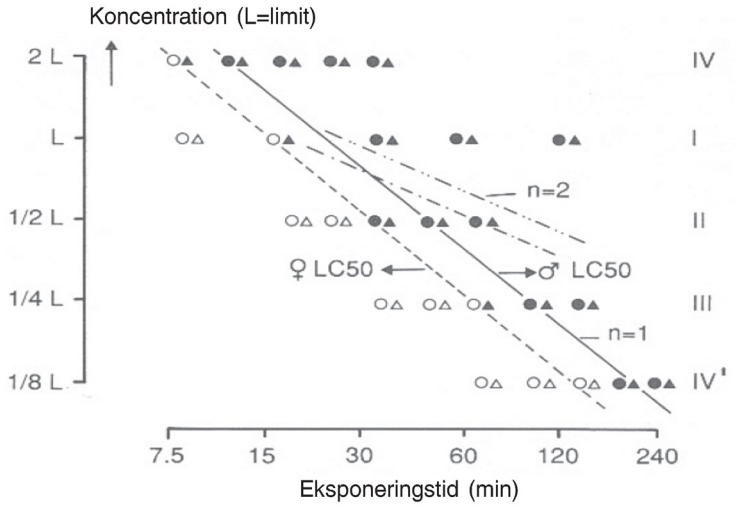
7. Koncentrationen i kammeret måles hyppigt for at bestemme den tidsvægtede gennemsnitskoncentration for hver eksponeringsvarighed. Dødstidspunktet for hvert dyr anvendes så vidt muligt i den statistiske analyse (i stedet for eksponeringsvarigheden).

8. Resultaterne af de første fire eksponeringssessioner undersøges med henblik på at identificere datamangler i koncentration-tidskurven (se figur 1). Ved utilstrækkelig tilpasning kan der gennemføres endnu en eksponering (femte koncentration). Koncentration og eksponeringsvarighed for den femte eksponering bør vælges, så denne mangel dækkes.

9. Alle eksponeringssessioner (herunder den første eksponeringssession) anvendes til at beregne forholdet mellem koncentration/tid/respons ved hjælp af statistisk analyse (16). Hvis det er muligt, anvendes den tidsvægtede gennemsnitskoncentration og eksponeringsvarigheden indtil død (hvis død indtræder i løbet af eksponeringen) for hvert C × t-interval.

*Figur 1*

**Hypotetisk illustration af forholdet mellem koncentration/tid/mortalitet hos rotter**




Åbne symboler = overlevende; udfyldte symboler = døde dyr

Trekanter = hunner; cirkler = hanner

Ubrudt linje = $LC_{50}$-værdier (interval 7,5-240 min.) for hanner med n = 1

Punkteret linje = $LC_{50}$-værdier (interval 7,5-240 min.) for hunner med n = 1

Stiplede linjer = hypotetiske $LC_{50}$-værdier for hanner og hunner, hvis n havde været lig med 2 (12).

Ordliste

Koncentration:

Eksponeringstid:

▼M4

10. Nedenfor findes et eksempel på en trinvis procedure:

**Eksponeringssession I — Test ved grænsekoncentration (se figur 1)**

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt ([a])

— Målkoncentration ([b]) = grænsekoncentration

— Fem grupper af dyr eksponeres ved denne målkoncentration i henholdsvis 15, 30, 60, 120 og 240 minutter

↓

**Eksponeringssession II ([c]) — Hovedforsøg**

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/2 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

↓

**Eksponeringssession III — Hovedforsøg**

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/4 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

↓

**Eksponeringssession IV′ — Hovedforsøg**

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en lavere koncentration ([d]) (1/8 L) i lidt længere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

**↓ eller**

([a]) Hvis der ikke findes oplysninger om kønsbetinget modtagelighed, anvendes rotter af begge køn, *dvs.* et dyr/køn pr. koncentration. Ud fra de eksisterende informationer, eller hvis det i løbet af eksponeringen konstateres, at det ene køn er mere modtageligt, anvendes 10 dyr af det mest modtagelige køn (to dyr pr. koncentration/tidspunkt) ved hvert koncentrationsniveau i den efterfølgende test.

([b]) Når forordning (EF) nr. 1272/2008 anvendes, er grænsekoncentrationerne for gasser, dampe og aerosoler henholdsvis 20 000 ppm, 20 mg/l og 5 mg/l. I tilfælde af forventet toksicitet eller afhængigt af resultaterne af forforsøget vælges lavere startkoncentrationer. I tilfælde af myndighedsbestemmelser eller videnskabelige behov kan der anvendes højere koncentrationer.

([c]) Ideelt udsættes eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Det giver forsøgslederen mulighed for at justere målkoncentrationen for den næste eksponeringsgruppe.

([d]) Den minimumsdosis (koncentration × tid), der resulterede i mortalitet under test med startkoncentrationen (første eksponeringssession) bruges som udgangspunkt ved fastlæggelsen af den næste kombination af koncentration og eksponeringsvarigheder. Koncentrationen reduceres typisk med det halve (1/2 L), og dyrene eksponeres i en ny tidsperiode med et mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 (√2; se reference 11) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. I denne figur (figur 1) blev mortalitet i eksponeringssession I først observeret ved 15 minutter. Varighederne i session II er derfor centreret omkring 30 minutter og er 15, 21 30, 42 og 60 minutter. Efter de første to eksponeringer anbefales det, at dataene indsættes i en figur som vist ovenfor, og det bør kontrolleres, om forholdet mellem koncentration og tid har en vinkel på 45 grader (n = 1), eller om forholdet mellem koncentration-tid-respons er mindre stejlt (f.eks. n = 2) eller stejlere (n = 0,8). I sidstnævnte tilfælde anbefales det på det kraftigste, at de næste koncentrationer og varigheder tilpasses tilsvarende.

▼M4

**Eksponeringssession IV — Hovedforsøg**

— Ét dyr pr. køn pr. koncentration/tidspunkt; 10 dyr i alt

— Fem grupper af dyr eksponeres ved en højere koncentration (e) (2 L) i lidt kortere tid (fordelt ved hjælp af faktor √2; se figur 1).

**Matematisk behandling af resultater til C × t-protokollen**

11. En C × t-fremgangsmåde med fire eller fem eksponeringskoncentrationer og fem varigheder giver henholdsvis 20 eller 25 datapunkter. Med disse datapunkter kan C × t-forholdet beregnes ved hjælp af statistisk analyse (16):

*Ligning 1*

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

hvor C = koncentration; t = eksponeringsvarighed, eller

*Ligning 2*

$$Response = f(C^n t)$$

hvor $n = b_1/b_2$.

Ved hjælp af ligning 1 kan $LC_{50}$-værdien beregnes for en given tidsperiode (f.eks. 4 timer, 1 time, 30 minutter eller en tidsperiode inden for de testede tidsperioder) ved hjælp af P = 5 (50 % respons). Bemærk, at Habers regel kun gælder, når n = 1. $LC_{01}$ kan beregnes ved hjælp af P = 2,67.

(e) I visse tilfælde kan det være nødvendigt at øge koncentrationen (2 L) i løbet af et nyt tidsinterval med et endnu mindre interval ved hjælp af en geometrisk opdeling af eksponeringsperioder med faktor 1,4 (√2) omkring det tidspunkt, hvor den mindste letale dosis (tid × koncentration) blev observeret i løbet af den første eksponering. Minimumseksponeringsvarigheden bør overstige 5 minutter. Maksimumseksponeringsvarigheden bør ikke overstige 8 timer.

▼B

B.3. **AKUT TOKSICITET (DERMAL)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres huden på flere grupper af forsøgsdyr i graduerede doser, idet der anvendes en bestemt dosis til hver enkelt gruppe. Der foretages observationer af virkningerne, herunder død. Dyr, der dør under forsaget, obduceres. Ved slutningen af forsøget aflives og obduceres overlevende dyr.

Det kan være nødvendigt, at dyr, der viser vedvarende symptomer på stærk smerte eller lidelse, aflives på human måde. Undersøgelse af stoffer på en måde, som på grund af deres ætsende eller lokalirriterende egenskaber vides at volde betydelig smerte og lidelse, er ikke påkrævet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgsgrupper, inden forsøget sættes i gang. Ca. 24 timer før forsøget påbegyndes, klippes eller barberes dyrene på ryggen. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af legemets overflade skal gøres klar til påføring af teststoffet. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Hvis der anvendes et vehikel, bør man tage hensyn til, om vehiklet har indflydelse på hudens permeabilitet for teststoffet. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer. For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at vægten af de anvendte dyr ikke må variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt ved forsøgets begyndelse.

▼B

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst fem dyr (af samme køn) til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Foreligger der oplysninger om, at et bestemt køn er væsentligt mere følsomt, benyttes der dyr af dette køn.

*Bemærk:* Ved anvendelse af højere dyr end gnavere til undersøgelse af akut toksicitet skal det overvejes, om antallet af dyr kan nedsættes. Doserne skal fastlægges med omhu, og man skal bestræbe sig på ikke at benytte højere doser end moderat toksiske doser. I sådanne undersøgelser bør indgift af dødelige doser af teststoffet undgås.

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der anvendes et tilstrækkeligt antal dosisniveauer, mindst tre, og disse skal være valgt således, at der opnås en graduering af de toksiske virkninger og dødeligheden i testgrupperne. Der bør ved valg af dosis tages hensyn til eventuelle hudirriterende eller ætsende virkninger. Der skal være tilstrækkelige data til, at der kan optegnes en dosis-virkningskurve og om muligt foretages en rimelig bestemmelse af $LD_{50}$.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Der kan med en gruppe på fem dyr af hvert køn udføres en grænsetest med en dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt efter den ovenfor beskrevne procedure. Optræder der teststofrelaterede dødsfald, kan gennemførelse af en fuldstændig undersøgelse komme i betragtning.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Observationsperioden skal være mindst 14 dage. Observationsperiodens varighed bør dog ikke fastsættes rigoristisk, men bestemmes ud fra de toksiske reaktioner, hvornår disse indtræder, og af restitutionsperiodens længde; den kan således forlænges, såfremt det anses for nødvendigt. Tidspunktet for, hvornår symptomer på toksicitet erkendes og forsvinder, samt dødstidspunktet er vigtige, navnlig hvis der er tendens til, at der indtræffer sene dødsfald.

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hver sit bur. Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel i en eksponeringsperiode på 24 timer. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert på plads, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales.

▼B

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Der foretages systematiske observationer, som registreres for hvert enkelt dyr. Observationerne skal foretages hyppigt i løbet af den første dag. Der skal foretages en grundig klinisk undersøgelse mindst én gang hver arbejdsdag. Herudover bør dyrene dagligt observeres, så det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen, dvs. at dyr, der findes døde, obduceres eller nedkøles, og at svage eller døende dyr isoleres eller aflives.

Inspektionen af dyrene skal omfatte forandringer i pels, behandlet hud, øjne og slimhinder, derudover åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet samt adfærdsmønsteret. Der bør foretages omhyggelig observation af rystelser, kramper, spytflåd, diarré, apati, søvn og bevidstløshed. Dødstidspunktet skal noteres så præcist som muligt. De dyr, der dør under forsøget, og de, der overlever til forsøgets afslutning, obduceres. Alle makroskopisk-patologiske forandringer registreres. På indikation udtages der vævsprøver til histopatologisk undersøgelse.

*Vurdering af toksiciteten hos det modsatte køn*

Efter afslutning af undersøgelsen med det ene køn testes en gruppe på fem dyr af det modsatte køn, så det konstateres, om dyr af dette køn er væsentligt mere følsomme over for teststoffet. I enkelte tilfælde kan anvendelse af færre dyr være velbegrundet. Foreligger der tilstrækkelige oplysninger om, at dyr af det køn, der er testet, er væsentligt mere følsomme, er test med dyr af det modsatte køn ikke påkrævet.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, dødstidspunkt for de enkelte dyr, antal dyr, der udviser andre symptomer på toksicitet, beskrivelse af toksiske virkninger og obduktionsresultater. Dyrenes individuelle vægt bestemmes og registreres, kort før teststoffet påføres, derefter ugentligt og endelig på dødstidspunktet. Vægtændringer beregnes og registreres for alle dyr, der lever mere end én dag efter påføringen af teststoffet. Aflivning af dyr på human måde på grund af lidelse og smerte fremkaldt af teststoffet registreres som teststofrelaterede dødsfald. $LD_{50}$ bestemmes efter en anerkendt metode.

Evaluering af data bør omfatte sammenhæng, hvis en sådan findes, mellem dyrenes eksponering for teststof og hyppighed og grad af alle forandringer, herunder adfærdsmæssige og kliniske symptomer, makroskopisk-patologiske forandringer, ændringer i legemsvægt, dødelighed og eventuelle andre toksiske virkninger.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

▼B

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser (herunder hvordan huden er renset og forbindingstypen; med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af typen af vehikel, hvor et sådant er anvendt, samt koncentration)

— forsøgsdyrenes køn

— tabelopstilling over reaktioner efter køn og dosis (dvs, antal dyr, der er døde eller aflivet under forsøget; antal dyr, der har vist symptomer på toksicitet; antal eksponerede dyr)

— dødstidspunktet efter eksponeringen, begrundelse og kriterier for human aflivning af dyr

— alle observationer

— $LD_{50}$ for det køn, der har været genstand for en fuldstændig undersøgelse, bestemt efter 14. dag med angivelse af beregningsmetode

— 95 % konfidensinterval for $LD_{50}$ (hvor det er muligt)

— dosis/dødelighedskurve og hældning, hvor beregningsmetoden muliggør det

— obduktionsfund

— eventuelle histopatologiske fund

— resultater af forsøg med det modsatte kan

— diskussion af resultaterne (med særlig opmærksomhed på, hvordan human aflivning af dyr under forsøget kan have indvirket på den beregnede $LD_{50}$)

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B (punkt D).

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B (punkt E).

▼B

B.4. **AKUT TOKSICITET: HUDIRRITATION/ÆTSNING**

1. **METODE**

Metoden er ækvivalent med OECD TG 404 (2002),

1.1. INDLEDNING

Ved udarbejdelse af denne ajourførte metode er der lagt særlig vægt på mulige forbedringer, dels vedrørende dyrevelfærd, dels vedrørende hensyntagen til alle foreliggende oplysninger om teststoffet for at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr, I metoden indgår en anbefaling om, at man før iværksættelse af den beskrevne in vivo-test for ætsning/irritation fremkaldt af stoffet gennemfører en weight-of-the-evidence-analyse af foreliggende relevante data, Er de foreliggende data utilstrækkelige, kan de udbygges ved sekventiel testning (1). Den anbefalede testningsstrategi, som omfatter validerede og anerkendte in vitro-test, er givet som bilag til denne metodebeskrivelse. Når det er hensigtsmæssigt, anbefales det desuden, at man i den indledende in vivo-test anbringer de tre testlapper successivt i stedet for samtidigt på dyret.

Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-test ikke udføres, før alle relevante data om stoffets potentielle hudætsende eller irriterende egenskaber er vurderet ved weight-of-the-evidence-analyse. Sådanne data består af dokumentation fra foreliggende undersøgelser i mennesker og/eller laboratoriedyr, dokumentation for ætsende/irriterende virkning af et eller flere strukturelt beslægtede stoffer eller af blandinger af sådanne stoffer, data, som viser at stoffet er stærkt surt eller alkalisk (2)(3), og resultater af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test (4)(5)(5a). En sådan analyse skulle mindske behovet for in vivo-testning for hudætsende/irriterende virkning af stoffer, som allerede er tilstrækkelig undersøgt i andre undersøgelser vedrørende disse to endepunkter.

En foretrukken testningsstrategi, som indebærer udførelse af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for ætsning/irritation, er medtaget som bilag til denne metodebeskrivelse, Strategien blev udviklet på en OECD-workshop (6) og enstemmigt anbefalet af deltagerne heri, og den er vedtaget som anbefalet testningsstrategi i det globalt harmoniserede system for klassificering af kemiske stoffer (GHS) (7). Skønt sekventiel testning ikke indgår som en del af testmetode B.4, anbefales det at følge denne testningsstrategi før iværksættelse af in vivo-forsøg, For nye stoffer anbefales den trinvise testningsstrategi til at indhente videnskabeligt forsvarlige oplysninger om stoffets ætsende/irriterende virkning. For eksisterende stoffer, som ikke er tilstrækkelig undersøgt for hudætsning/irritation, bør strategien anvendes til at supplere de mangelfulde data. Anvendes en anden testningsstrategi eller -metode, eller beslutter man sig for ikke at følge den trinvise testningsstrategi, bør dette begrundes.

Hvis de ætsende eller irriterende egenskaber ikke kan bestemmes ved weight-of-the-evidence-analyse i henhold til den sekventielle testningsstrategi, bør in vivo-testning overvejes (jf. bilaget).

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Hudirritation:** fremkaldelse af reversibel skade på huden ved applikation af teststoffet i indtil fire timer.

**Hudætsning:** fremkaldelse af irreversibel skade på huden, dvs, synlig nekrose gennem epidermis og ned i dermis efter applikation af teststoffet i indtil fire timer. Typiske ætsningsreaktioner er sår, blødning, blodige skorper, efter 14 dages observation affarvning som følge af blegning af huden, hele områder med alopeci samt ardannelse. Tvivlsomme læsioner bør overvejes vurderet ved histopatologisk undersøgelse.

1.3. METODENS PRINCIP

En enkelt dosis af teststoffet påføres på huden af et forsøgsdyr; de ubehandlede hudområder af dyret tjener som kontrol. Graden af irritation/ætsning bestemmes og klassificeres med de foreskrevne intervaller og beskrives yderligere, således at virkningerne evalueres komplet. Undersøgelsen skal strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkningers reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.

Dyr, som viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte i nogen del af forsøget, aflives humant, og teststoffet vurderes tilsvarende, Kriterier for afgørelsen om human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i henvisning (8).

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelse til in vivo-forsøget**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Det fortrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge kønsmodne dyr. Anvendes andre arter, skal der fremlægges begrundelse herfor.

1.4.1.2. *Forberedelse af dyrene*

Ca. 24 timer før forsøget fjernes pelsen ved tæt klipning af dyrenes ryg. Der drages omsorg for at undgå beskadigelse af huden, og kun dyr med sund, intakt hud må anvendes.

Visse kaninstammer har pletter med tæt hårvækst, som er mere eller mindre fremtrædende, afhængigt af årstiden. Sådanne områder med tæt hårvækst må ikke anvendes som testområder.

1.4.1.3. *Miljøbetingelser og fodring*

Dyrene holdes i hver sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 20 °C (± 3 °C) for kaniner. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og må ikke være over 70 %, hvilket dog ikke gælder under under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

▼B

1.4.2. **Prøveprocedure**

1.4.2.1. *Applikation af teststoffet*

Teststoffet påføres på et lille område (ca. 6 $cm^2$) af huden og dækkes med en gazelap, som holdes på plads med en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Hvis der anvendes flydende eller pastaagtige teststoffer, kan det være nødvendigt at påføre teststoffet på gazelappen, og derefter placere lappen på huden. I ekspositionsperioden bør teststoffet holdes i løs kontakt med huden ved hiælp af en passende semiokklusiv forbinding. Hvis teststoffet påføres på gazelappen, skal denne fastgøres til huden, således at der er god kontakt og ensartet fordeling af stoffet på huden. Dyret må ikke have adgang til gazelappen og skal være forhindret i at kunne indtage eller inhalere teststoffet.

Væskeformige teststoffer anvendes sædvanligvis ufortyndet. Ved testning af faste stoffer som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med den mindst mulige mængde vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Anvendes andre vehikler end vand, må dette kun have minimal indflydelse på teststoffets hudirriterende virkning.

Ved slutningen af ekspositionsperioden, som normalt er fire timer, fjernes tilbagesiddende teststof, så vidt muligt ved hjælp af vand eller et egnet oplysningsmiddel, idet man skal undgå at påvirke det fremkomne respons eller beskadige epidermis.

1.4.2.2. *Dosisniveau*

Testarealet påføres 0,5 ml flydende eller 0,5 g fast eller halvflydende teststof.

1.4.2.3. *Indledende test (in vivo-hudirritations/ætsningstest i ét dyr)*

Det anbefales kraftigt, at in vivo-testen indledende kun udføres i ét dyr, navnlig når stoffet mistænkes for at have potentiale for ætsning. Dette er i overensstemmelse med den sekventielle testningsstrategi (jf. bilag 1).

Når et stof er bedømt som ætsende på grundlag af weight-of-the-evidence-analyse, kræves ikke yderligere dyreforsøg. For størstedelen af de stoffer, som mistænkes for at være ætsende, er yderligere in vivo-testning sædvanligvis unødvendig. I tilfælde, hvor der menes at være behov for supplering af mangelfulde data, kan en begrænset testning i dyr gennemføres med følgende fremgangsmåde: Der anbringes successivt indtil tre prøvelapper på dyret. Den første lap fjernes efter tre minutter. Ses ingen alvorlig hudirritation, anbringes endnu en prøvelap, som fjernes efter en time. Viser iagttagelserne på dette trin, at ekspositionen humant kan udvides til fire timer, anbringes en tredje lap, som fjernes efter fire timer, hvorpå responset vurderes.

Iagttages en ætsende virkning efter nogen af de tre sekventielle ekspositioner, afsluttes forsøget straks. Iagttages ingen ætsende virkning, efter at den sidste lap er fjernet, observeres dyret i 14 dage, medmindre der udvikler sig ætsning på et tidligere tidspunkt.

▼B

I tilfælde, hvor teststoffet ikke forventes at frembringe ætsning, men kan være irriterende, anbringes en enkelt lap på ét dyr i fire timer.

1.4.2.4. *Verifikationstest (in vivo-hudirritationstest i flere dyr)*

Er der ikke iagttaget ætsende virkning i det indledende forsøg, skal den irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr, hver med én lap, ved en ekspositionsperiode på fire timer. Iagttages en irriterende virkning i det indledende forsøg, kan verifikationsforsøget udføres sekventielt eller ved eksposition af yderligere to dyr samtidigt. Er det indledende forsøg undtagelsesvis ikke udført, kan to-tre dyr behandles med en enkelt lap, som fjernes efter fire timer. Anvendes to dyr som begge udviser samme respons, er yderligere testning unødvendig. I modsat fald udføres forsøget også på det tredje dyr. Er responset usikkert, kan det være nødvendigt at evaluere resultaterne ved brug af flere dyr.

1.4.2.5. *Observationsperiode*

Undersøgelsen skal strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at de iagttagne virkningers reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes. Forsøget skal imidlertid afsluttes, når som helst dyrene viser vedvarende tegn på stærk smerte eller lidelser. For at bestemme reversibiliteten af virkningerne skal dyrene iagttages indtil 14 dage efter fjernelse af lapperne. Iagttages reversibilitet inden 14 dage, afsluttes forsøget på dette tidspunkt.

1.4.2.6. *Kliniske iagttagelser og klassificering af hudreaktioner*

Alle dyr undersøges for tegn på erythem og ødem, og responset tildeles score-værdi ved 60 minutter og derefter ved 24, 48 og 72 timer efter fjernelse af lappen. Til det indledende forsøg i ét dyr undersøges testområdet desuden straks efter fjernelse af lappen. Hudreaktioner klassificeres og registreres efter inddelingen i nedenstående tabel. Er der hudskade, som ikke kan identificeres som irritation eller ætsning ved 72 timer, kan det være nødvendigt at fortsætte iagttagelsen indtil dag 14 for at fastslå reversibiliteten af virkningerne. Foruden iagttagelsen for irritation skal alle lokale toksiske virkninger, således tab af hudens fedtstofindhold, og alle systemiske bivirkninger (f.eks. kliniske symptomer på toksicitet samt kropsvægt), beskrives fuldstændigt og registreres. Til afklaring af en usikker respons bør histopatologisk undersøgelse indgå i vurderingen.

Klassificering af hudrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af hudresponset og for at bistå prøvningslaboratorierne og dem, som foretager og fortolker iagttagelserne, må iagttagelserne foretages af personer, som er tilstrækkelig fortrolige med det anvendte score-system (se nedenstående tabel). Det kan være nyttigt at anvende en illustreret vejledning i klassificering af hudirritation og andre læsioner (9).

2. **DATA**

2.1. PRÆSENTATION OF RESULTATER

Undersøgelsens resultater, som sammenfattes i tabelform i den endelige testrapport, skal dække alle punkter i afsnit 3.1.

▼B

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Score-værdierne for hudirritation vurderes i tilknytning til læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet. De enkelte score-værdier repræsenterer ikke en absolut standard for et stofs irritationsfremkaldende egenskaber, da andre virkninger af teststoffet ligeledes vurderes. I stedet må de enkelte score-værdier betragtes som vejledende værdier, som skal evalueres sammen med alle undersøgelsens øvrige fund.

Hudlæsionernes reversibilitet skal tages i betragtning ved bedømmelse af irritationsrespons. Hvis respons som alopeci (af et begrænset område) hyperkeratose, hyperplasi og skældannelse persisterer indtil slutningen af den 14-dags observationsperiode, anses teststoffet for irriterende.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Rationale for in vivo-testning: weight-of-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle testningsstrategi:

— beskrivelse af relevante oplysninger fra foreliggende tidligere forsøg

— oplysninger, som fremgår af de enkelte trin i testningsstrategien

— beskrivelse af udførte in vitro-test med detaljeret beskrivelse af de anvendte metoder samt resultater opnået med prøve- og reference stof

— weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-undersøgelse.

Prøvestof:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS-nummer, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batch-nummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. pH. flygtighed, opløselighed, stabilitet)

— for blandinger, sammensætning og relativ procentdel af bestanddelene.

Vehikel:

— identifikation, koncentration (i givet fald), anvendt volumen

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— anvendt art/stamme, rationale for anvendelse af andre dyr end albinokaniner

— antal dyr af hvert køn

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse og slutning

— alder ved forsøgets begyndelse

— dyrenes oprindelse, forsøgsbetingelser, kost osv.

▼B

Omstændigheder ved forsøget:

— teknik ved præparation af anbringelsesstedet for lapperne

— enkeltheder vedrørende anvendte lapmaterialer og teknik ved anbringelse af lappen

— enkeltheder vedrørende præparation og påføring og fjernelse af teststoffet.

Resultater:

— opstilling i tabelform af score-værdier for irritation/ætsning for hvert dyr ved alle måletidspunkter

— beskrivelse af alle iagttagne læsioner

— forklarende beskrivelse af art og grad af den iagttagne irritation eller ætsning, samt eventuelle histopatologiske fund

— beskrivelse af andre skadelige lokale (f.eks. tab af hudens fedtindhold) og systemiske virkninger foruden hudirritation eller ætsning.

— Diskussion af resultater

4. **HENVISNINGER**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain: M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner I., Giuliani, A., Grav, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19-26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, VL (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, »Skin Irritation«, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Bruxelles.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M. Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483-524.

(5a) Forsøgsmetode B.40 Hudætsning.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Afholdt i Solna, Sverige, den 22.-24. januar 1996 (http://wwwl.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtaget på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier, november 1998 (http://wwwl.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition. Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Satety Publitations. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington, DC, august 1990.

[kan rekvireres fra OECD's sekretariat].

▼B

*Tabel I*

**KLASSIFICERING AF HUDREAKTIONER**

**Erythem og escharadannelse**

| | |
|---|---|
| Intet erythem | 0 |
| Meget let erythem (knapt diagnosticerbart) | 1 |
| Veldefineret erythem | 2 |
| Moderat til svært erythem | 3 |
| Svært erythem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erythemet | 4 |

Maksimumværdi: 4

**Ødemdannelse**

| | |
|---|---|
| Intet ødem | 0 |
| Meget let ødem (næppe synligt) | 1 |
| Let ødem (tydeligt afgrænset hævet område) | 2 |
| Moderat ødem (hævet ca. 1 mm) | 3 |
| Svært ødem (hævet mere end 1 mm og udstrækning ud over det eksponerede område) | 4 |

Maksimumværdi: 4

Til afklaring af usikre responser kan histopatologisk undersøgelse foretages.

▼B

*BILAG*

**Sekventiel testningsstrategi for hudirritation og ætsning**

**GENERELLE OVERVEJELSER**

Af hensyn til den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd er det vigtigt at undgå unødvendig brug af dyr og at minimere alle forsøg, som kan forventes at fremkalde svære reaktioner i dyr. Alle oplysninger om et stofs potentielle hudætsende og irriterende egenskaber skal vurderes, før in vivo-testning overvejes. Det kan tænkes, at der allerede foreligger tilstrækkelige vidnesbyrd til, at teststoffets hudætsende eller irriterende potentiale kan klassificeres uden laboratorieforsøg i dyr, Ved hjælp af weight-of-the-evidence-analyse og en sekventiel testningsstrategi kan behovet for in vivo-testning således nedsættes til et minimum, navnlig når stoffet forventes at fremkalde svære reaktioner.

Det anbefales, at de foreliggende oplysninger om stoffers hud irriterende og ætsende egenskaber vurderes ved weight-of-the-evidence-analyse for at afgøre, om der bortset fra in vivo-hudundersøgelser bør udføres supplerende undersøgelser til yderligere karakterisering af et sådant potentiale. Når yderligere undersøgelser er nødvendige, anbefales det at benytte den sekventielle testningsstrategi til udbygning af de relevante forsøgsdata. For ikke tidligere testede stoffer anvendes den sekventielle testningsstrategi til at udbygge det sæt data, som er nødvendigt til vurdering af stoffets potentiale for hudirritation/ætsning. Den i dette bilag beskrevne testningsstrategi er udviklet på en OECD-workshop (1) og senere bekræftet og udvidet i form af Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Enviranmental Effects of Chemical Substanses, som vedtoges på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier i november 1998 (2).

Skønt denne sekventielle testning ikke indgår som en del af testmetode B.4, er det den anbefalede strategi til bestemmelse af hudirritation/ætsning. Strategien repræsenterer både bedste praksis og en etisk standard for in vivo-testning af hudirritation/ætsning. Metoden giver vejledning i udførelse af in vivo-forsøg og sammenfatter de faktorer, som man bør tage i betragtning før et sådant forsøg påbegyndes. Strategien tilvejebringer en metode til evaluering af foreliggende oplysninger om teststoffets hudirriterende og ætsende egenskaber og en trinvis fremgangsmåde til at generere relevante data om stoffer, som har behov for yderligere undersøgelse eller ikke er blevet undersøgt, Den giver desuden anbefalinger før udførelse af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for hudætsning/irritation under nærmere bestemte forhold.

**BESKRIVELSE AF STRATEGIEN FOR VURDERING OG TESTNING**

Før man iværksætter test som led i den sekventielle testningsstrategi (vist i figuren), skal alle foreliggende oplysninger vurderes for at fastlægge nødvendigheden af in vivo-hudtest. Skønt vurdering af enkeltparametre (f.eks ekstremt pH) i sig selv kan tænkes at give væsentlige oplysninger, må alle de foreliggende oplysninger betragtes under ét. Som grundlag for en afgørelse baseret på weight-of-the-evidence må alle relevante oplysninger om virkningerne af det pågældende stof og af analoge stoffer evalueres, og et rationale for afgørelsen fremlægges. Primært må de foreliggende data om stoffets virkning på dyr og mennesker tillægges vægt, efterfulgt af resultaterne af in vitro- eller ex vivo-testning, Når det på nogen måde er muligt, bør *in vivo*-undersøgelser af ætsende stoffer undgås. I testningsstrategien bør følgende faktorer tages i betragtning:

▼B

*Vurdering af foreliggende data fra mennesker og dyr (trin 1)*. Foreliggende data fra mennesker, f.eks. kliniske undersøgelser eller arbejdsmiljøundersøgelser, og case-undersøgelser fra f.eks. toksicitetsundersøgelser med enkelt eller gentagen hudeksposition bør primært tages i betragtning, da de giver oplysninger direkte om virkningerne på huden. Stoffer med kendt irriterende eller ætsende virkning og stoffer, for hvilke der foreligger klare vidnesbyrd om fravær af ætsende eller irriterende virkning, behøver ikke testes in vivo.

*Analyse af struktur/aktivitet (trin* 2). Resultater fra eventuelle undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer skal tages i betragtning. Når der for strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer foreligger tilstrækkelige data fra mennesker og/eller dyr til at bestemme deres hudætsende/irriterende potentiale, kan teststoffet antages at ville frembringe samme respons. I sådanne tilfælde behøver teststoffet ikke testes. Negative data fra undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer udgør ikke tilstrækkeligt bevis for fravær af ætsende eller irriterende egenskaber af et stof i den sekventielle testningsstrategi. Potentialet for både hudætsning og hudirritation bør fastlægges ved validerede og anerkendte metoder til struktur/aktivitet analyse.

*Fysisk-kemiske egenskaber og kemisk reaktivitet (trin 3*). Stoffer, som udviser ekstremt pH som $\leq$ 2,0 og $\geq$ 11,5 kan have stærke lokale virkninger. Hvis et ekstremt pH er grundlaget for at udpege et stof som hudætsende, kan også dets syre/basereserve (eller bufferkapacitet) tages i betragtning (3)(4). Hvis bufferkapaciteten tyder på, at et stof muligvis ikke er hudætsende, udføres videre testning til bekræftelser heraf, fortrinsvis med brug af en valideret og anerkendt in vitro- eller ex vivo-test (jf. trin 5 og 6).

*Hudtoksicitet (trin 4)*. Er et kemisk stof påvist meget toksisk ved optagelse gennem huden, kan *in vivo*-undersøgelse af dets hudirriterende/ætsende egenskaber muligvis ikke gennemføres i praksis, fordi den mængde teststof, som normalt påføres, kan overstige det stærkt toksiske niveau og følgelig vil medføre død eller svære lidelser for dyrene. Når der i forvejen er udført en hudtoksicitetsundersøgelse i albinokaniner med en dosering op til grænsen på 2 000 mg/kg kropsvægt eller højere, uden at man herved har fundet hudirritation eller ætsning, er yderligere testning for hudirritation/ætsning muligvis overflødig. Vurdering af akut hudtoksicitet på grundlag af tidligere udførte undersøgelser kræver en række overvejelser. For eksempel kan de rapporterede oplysninger om hudlæsioner være ufuldstændige. Testning og observationer kan være gjort i andre arter end kaniner, og der kan være store artsforskelle i følsomheden af responset. Endvidere kan den form, hvori teststoffet er tilført dyrene, have være uegnet til vurdering af hudirritation/ætsning (f.eks stoffets fortynding ved undersøgelse af hudtoksicitet (5)), I de tilfælde, hvor der foreligger veldesignede og veludførte hudtoksicitetsundersøgelser i kaniner, kan negative fund anses som tilstrækkelig dokumentation for, at stoffet ikke er ætsende eller irriterende.

*Resultater af in vitro- eller ex vivo-undersøgelser (trin 5 og 6)*. Stoffer, som har udvist ætsende eller stærkt irriterende egenskaber i en valideret og anerkendt in vitro- eller ex vivo-undersøgelse (6)(7), hvis design er rettet mod vurdering af disse særlige virkninger, behøver ikke testes i dyr. Sådanne stoffer må antages at ville frembringe tilsvarende svære virkninger in vivo.

▼B

*In vivo-test i kaniner (trin 7 og 8)*. Hvis weight-of the-evidence-analyse giver grundlag for at udføre *in vivo*-forsøg, bør disse begynde med en indledende test i ét dyr. Viser denne test, at stoffet ætser huden, bør der ikke udføres yderligere test. Er der ikke fundet ætsende virkning i det indledende forsøg, skal det irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr med en ekspositionsperiode på fire timer. Hvis der iagttages en irriterende virkning i det indledende forsøg, kan der udføres et sekventielt verifikationsforsøg, eller yderligere to dyr kan eksponeres samtidigt.

**HENVISNINGER**

(1) OECD (1996), Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, afholdt i Solna, Sverige, den 22.-24. januar 1996 (http://www.1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtaget på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier, november 1998 (http://www.1oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P, Fentem J.H., Balls M, Botham P.A., Curren R.D, Earl L.K, Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26.709-720.

(4) Young, J.R. How, M.J., Walker, A.P., Worth. W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic *in Vitro*, 2 (1) s. 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick. E, Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and *in Vitro* Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (red.): Dermatotoxicology. Femte udgave ISBN 1-56032-356-6, kapitel 31, 411-436.

(6) Forsøgmetode B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter. H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology *in Vitro* 12, s. 483-524.

▼B

*Figur*

**EN STRATEGI FOR TESTNING OG VURDERING AF HUDIRRITATION/ÆTSNING**

| | Activity | Finding | Conclusion |
|---|---|---|---|
| 1 | Existing human and/or animal data showing effects on skin or mucous membranes | Corrosive | Apical endpoint; considered corrosive. No testing is needed. |
| | | Irritating | Apical endpoint; considered to be an irritant. No testing is needed. |
| | | Not corrosive/not irritating | Apical endpoint; considered not corrosive or irritating. No testing required. |
| | ↓ *No information available, or available information is not conclusive* ↓ | | |
| 2 | Perform SAR evaluation for skin corrosion/irritation | Predict severe damage to skin | Considered corrosive. No testing is needed. |
| | | Predict irritation to skin | Considered an irritant. No testing is needed. |
| | ↓ *No predictions can be made, or predictions are not conclusive or negative* ↓ | | |
| 3 | Measure pH (consider buffering capacity, if relevant) | pH ≤ 2 or ≥ 11.5 (with high buffering capacity, if relevant) | Assume corrosivity. No testing is needed. |
| | ↓ *2 < pH < 11.5, or pH ≤ 2.0 or ≥ 11.5 with low/no buffering capacity, if relevant* ↓ | | |
| 4 | Evaluate systemic toxicity data via dermal route (1) | Very toxic | No further testing is needed. |
| | | Not corrosive or irritating when tested to limit dose of 2000 mg/kg body weight or higher, using rabbits | Assume not corrosive or irritating. No further testing is needed. |
| | ↓ *Such information is not available or is non-conclusive* ↓ | | |
| 5 | Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin corrosion | Corrosive response | Assume corrosivity *in vivo*. No further testing is needed. |
| | ↓ *Substance is not corrosive* ↓ | | |
| 6 | Perform validated and accepted *in vitro* or *ex vivo* test for skin irritation | Irritant response | Assume irritancy *in vivo*. No further testing is needed. |
| | ↓ *Validated in vitro or ex vivo testing methods for skin irritation are not yet available or substance is not an irritant* ↓ | | |
| 7 | Perform initial *in vivo* rabbit test using one animal | Severe damage to skin | Considered corrosive. No further testing is needed. |
| | ↓ *No severe damage* ↓ | | |
| 8 | Perform confirmatory test using one or two additional animals | Corrosive or irritating | Considered corrosive or irritating. No further testing is needed |
| | | Not corrosive or irritating | Considered not corrosive or irritating. No further testing needed |

(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **AKUT TOKSICITET, ØJENIRRITATION**

1. **METODE**

Metoden er ækvivalent med OECD TG 405 (2002).

1.1. INDLEDNING

Ved udarbejdelse af denne ajourførte metode er der lagt særlig vægt på de forbedringer, som kan opnås ved at vurdere alle foreliggende oplysninger om teststoffet med henblik på at undgå unødvendige forsøg med laboratoriedyr og dermed komme betænkeligheder omkring dyrenes velfærd i møde. I metoden indgår en anbefaling om, at der før iværksættelse af den beskrevne in vivo-test for akut øjenirritation/ætsning udføres en weight-of-the-evidence-analyse (1) af foreliggende relevante data, Er de foreliggende data utilstrækkelige, anbefales det, at de suppleres ved sekventiel testning (2)(3). Den anbefalede testningsstrategi, som omfatter validerede og anerkendte in vitro-test, er givet som bilag til denne metodebeskrivelse, Derudover anbefales det at udføre en in vivo-test for hudirritation/ætsning med henblik på at kunne forudsige ætsning af øjet, før en in vivo-øjentest overvejes gennemført.

Både den videnskabelige kvalitet og dyrenes velfærd fremmes ved, at in vivo-test ikke udføres, før alle relevante data om stoffets potentielle øjenætsende eller -irriterende egenskaber er vurderet ved weight-of-the-evidence-analyse, Sådanne data består af dokumentation fra foreliggende undersøgelser i mennesker og/eller laboratoriedyr, dokumentation for ætsende/irriterende virkning af et eller flere strukturelt beslægtede stoffer eller af blandinger af sådanne stoffer, data, som viser at stoffet er stærkt surt eller alkalisk (4)(5), og resultater af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for hudætsning og -irritation (6)(6a). Undersøgelserne kan enten have været udført inden en weight-of-the-evidence-analyse eller efterfølgende som resultat heraf.

For visse stoffer kan en sådan analyse vise, at der er behov for in vivo-undersøgelser af stoffets potentiale for ætsning/irritation af øjnene, I alle sådanne tilfælde skal man, før en in vivo-øjentest påtænkes, helst først udføre en undersøgelse af stoffets virkninger på hud in vivo og vurdere denne i henhold til forsøgsmetode B.4 (7). Anvendelse af weight-of-the-evidence-analyse og sekventiel testningsstrategi skulle mindske behovet for in vivo-testning for ætsende/irriterende virkning på øjet af stoffer, som allerede er tilstrækkelig undersøgt i andre undersøgelser. Kan stoffets potentiale for ætsning eller irritation af øjet ikke bestemmes ved den sekventielle testningsstrategi, selv efter udførelse af en in vivo-undersøgelse af hudætsning og irritation, kan der udføres en in vivo-test for ætsning/irritation af øjet.

▼B

En anbefalet testningsstrategi, som indebærer udførelse af validerede og anerkendte in vitro- eller ex vivo-test for ætsning/irritation, er medtaget som bilag til denne metodebeskrivelse. Strategien blev udviklet på en OECD-workshop (8) og enstemmigt anbefalet af deltagerne heri, og den er vedtaget som anbefalet testningsstrategi i det globalt harmoniserede system for klassificering af kemiske stoffer (GHS) (9). Skønt sekventiel testning ikke indgår som en del af testmetode B.4, anbefales det at følge denne testningsstrategi, før in vivo-forsøg iværksættes, For nye stoffer anbefales den trinvise testningsstrategi til at indhente videnskabeligt forsvarlige oplysninger om stoffets ætsende/irriterende virkning. For eksisterende stoffer, som ikke er tilstrækkelig undersøgt for øjenætsning/irritation, bør man følge denne strategi for at supplere de mangelfulde data, Anvendes en anden testningsstrategi eller -metode, eller beslutter man sig for ikke at følge den trinvise testningsstrategi, bør dette begrundes.

1.2. DEFINITIONER

**Øjenirritation** er frembringelse af forandringer i øjet, som opstår efter påføring af et teststof på øjets anteriore overflade, og som er fuldt reversible inden for 21 dage efter påføring.

**Ætsning af øjet** er frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter påføring af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter påføring.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

En enkelt dosis af teststoffet påføres dyrets ene øje; det ubehandlede øje tjener som kontrol. Graden af øjenirritation/ætsning vurderes ved tildeling af score-værdier til læsionerne af conjunctiva, cornea og iris med bestemte intervaller, Andre virkninger på øjet og systemiske negative virkninger beskrives ligeledes, således at man har en fuldstændig bedømmelse af virkningerne. Undersøgelsen skal strække sig over tilstrækkelig lang tid til, at virkningernes reversibilitet eller irreversibilitet kan vurderes.

Dyr, som viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte i nogen del af forsøget, aflives humant, og teststoffet vurderes tilsvarende, Kriterier for human aflivning af døende og stærkt lidende dyr kan findes i reference (10).

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelse til in vivo-forsøget**

1.4.1.1. *Valg af art*

Det foretrukne forsøgsdyr er albinokaninen, og der anvendes raske unge kønsmodne dyr. Anvendes andre arter, skal der fremlægges begrundelse herfor.

1.4.1.2. *Forberedelse af dyrene*

På hvert af de foreløbigt udvalgte dyr undersøges begge øjne højst 24 timer før testen begynder. Dyr, som udviser øjenirritation eller øjendefekter, eller som i forvejen har beskadiget cornea, må ikke anvendes.

▼B

1.4.1.3. *Miljøbetingelser og fodring*

Dyrene holdes i hver sit bur. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 20 ºC (± 3 ºC) for kaniner. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke være over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand.

1.4.2. **Prøveprocedure**

1.4.2.1. *Applikation af teststoffet*

Teststoffet anbringes i conjunctivalsækken af det ene øje på hvert dyr, idet det nederste øjenlåg forsigtigt trækkes lidt ud fra øjeæblet. Derefter holdes øjenlågene sammen i ca. et sekund for at forhindre, at noget af stoffet løber ud. Det ubehandlede øje fungerer som kontrol.

1.4.2.2. *Skylning*

I mindst 24 timer efter instillation af teststoffet må der ikke foretages skylning af forsøgsdyrenes øjne, bortset fra faststof (jf. punkt 1.4.2.3.2) eller i tilfælde af øjeblikkeligt indsættende ætsende eller irriterende virkning. Ved 24 timer kan øjet skylles, hvis det anses for hensigtsmæssigt.

Anvendelse af en satellitgruppe af dyr til undersøgelse af virkningen af skylningen kan ikke anbefales, medmindre det er videnskabeligt begrundet, Er en satellitgruppe nødvendig, skal den bestå af to kaniner. Skylningsomstændighederne skal nøje dokumenteres, således skylningstidspunkt, skyllevæskens sammensætning og temperatur samt skylningens varighed, anvendt væskevolumen og -hastighed.

1.4.2.3. *Dosisniveau*

1.4.2.3.1 *Undersøgelse af væsker*

Ved undersøgelse af flydende stoffer anvendes 0,1 ml. Der må ikke anvendes pumpespray til direkte instillation af stoffet i øjet. I stedet sprøjtes væske ud af sprayflasken og opsamles i et kar, før der instilleres 0,1 ml i øjet.

1.4.2.3.2. *Undersøgelse af faste stoffer*

Ved undersøgelse af faste stoffer, pastaer og fintfordelte faste stoffer anvendes et volumen på 0,1 ml eller en vægtmængde på højst 100 mg. Prøvestoffet rives til finkornet støv. Partiklernes volumen måles efter let sammenpresning, f.eks. frembragt ved små slag på målekarret. Er det faste teststof ikke forsvundet fra dyrets øje ad naturlig vej på det første observationstidspunkt 1 time efter behandlingen, kan øjet skylles med saltvand eller destilleret vand.

▼B

1.4.2.3.3. *Undersøgelse af aerosoler*

Det anbefales, at alle pumpesprayprodukter og aerosoler opsamles før instillation i øjet. Som eneste undtagelse gælder stoffer, som er under tryk i aerosolbeholder og ikke kan opsamles på grund af fordampning. I sådanne tilfælde holdes øjet åbent, og teststoffet administreres i øjet med et enkelt pust på ca. ét sekund fra en afstand af 10 cm direkte foran øjet. Afstanden kan variere afhængigt af trykket i aerosolbeholderen og dens indhold. Der må drages omsorg for at undgå skade på øjet som følge af trykket i spraydåsen. I visse tilfælde kan der være brug for at vurdere potentialet for »mekanisk« skade på øjet forårsaget af forstøvningens styrke.

Den afgivne dosis fra aerosolbeholderen kan vurderes ved at simulere prøven på følgende måde: Stoffet sprøjtes på vejepapir gennem en åbning af størrelse som et kaninøje placeret umiddelbart foran papiret. Papirets vægtforøgelse anvendes som omtrentligt mål for den mængde, der tilføres øjet ved forstøvning. For flygtige stoffer kan dosis vurderes ved vejning af den modtagende beholder før og efter udtagning af teststof.

1.4.2.4. *Indledende test (in vivo-øjenirritations/ætsningstest i ét dyr*

Som nævnt i den sekventielle teststrategi (se bilag 1), anbefales det stærkt, at in vivo-testen indledende udføres i kun ét dyr.

Viser denne test, at stoffet virker ætsende eller stærkt irriterende på øjet ved brug af den beskrevne fremgangsmåde, bør der ikke udføres yderligere test for øjenirritation.

1.4.2.5. *Lokalanæstetika*

Der kan anvendes lokalanæstetika efter stillingtagen i hvert enkelt tilfælde. Hvis weight-of-the-evidence-analysen viser, at stoffet har smertevoldende potentiale, eller hvis den indledende testning viser, at der vil komme en smertefuld reaktion, kan der bruges et lokalanæstetikum før instillation af teststoffet. Art, koncentration og dosering af lokalanæstetikum bør vælges omhyggeligt med henblik på at sikre, at dets anvendelse ikke medfører forskelle i reaktionen på teststoffet. Kontroløjet lokalbedøves på tilsvarende måde.

1.4.2.6. *Verifikationstest (in vivo-øjenirritationstest i yderligere dyr)*

Har det indledende forsøg ikke vist ætsende virkning, bør det irriterende eller negative respons verificeres i indtil to yderligere dyr. Iagttages der i det indledende forsøg en svær irriterende virkning, som tyder på, at der måske kan forventes en stærk (irreversibel) virkning i verifikationsforsøget, anbefales det at udføre dette sekventielt i ét dyr ad gangen frem for at eksponere yderligere to dyr samtidig. Udviser det andet dyr ætsning eller svær irritation, standses forsøget. Til verifikation af en svag eller moderat irritationsrespons kan det være nødvendigt at anvende yderligere dyr.

▼B

1.4.2.7. *Observationsperiode*

lagttagelsesperioden skal være tilstrækkelig lang til, at de iagttagne virkningers omfang og reversibilitet kan vurderes fuldt ud. Forsøget skal dog afsluttes, når som helst dyrene viser vedvarende tegn på stærk smerte eller lidelser (9). For at bestemme reversibiliteten af virkningerne skal dyrene sædvanligvis iagttages indtil 21 dage efter administration af teststoffet. Iagttages reversibilitet inden 21 dage, afsluttes forsøget på dette tidspunkt.

1.4.2.7.1. *Kliniske iagttagelser og klassificering af øjenreaktioner*

Øjnene undersøges 1, 24, 48 og 72 timer efter påføring af teststoffet. Dyrene skal ikke forblive længere i forsøget, end indtil dette har har givet definitive oplysninger. Dyr, som viser tegn på stærk lidelse og/eller smerte i nogen del af forsøget, skal omgående aflives humant, og teststoffet vurderes tilsvarende, Når følgende øjenlæsioner optræder efter instillation af teststoffet, skal dyret aflives humant: perforation af cornea eller nævneværdig ulceration af cornea, herunder staphylom; blod i forreste øjenkammer; uklarhed af cornea af grad 4, persisterende i 48 timer; manglende reaktion på lys (irisrespons grad 2), persisterende i 72 timer; ulceration af conjunctivaslimhinden; nekrose af conjunctivae eller blinkhinde; rynker i cornea. Begrundelsen herfor er, at sådanne læsioner sædvanligvis er irreversible.

For dyr, som ikke udvikler øjenlæsioner, kan forsøget afsluttes tidligst 3 dage efter instillation, Dyr med lette til moderate læsioner observeres, indtil læsionerne forsvinder, eller i 21 dage, på hvilket tidspunkt forsøget afsluttes, På dag 7, 14 og 21 foretages observation til bestemmelse af læsionernes status og reversibilitet eller irreversibilitet.

Graden af øjenreaktion (conjunctivae, cornea and iris) registreres ved hver undersøgelse (tabel I). Alle andre læsioner i øjet (f.eks. pannus, farvning) og systemiske negative virkning skal ligeledes rapporteres.

Undersøgelse af reaktionerne kan lettes ved brug af lup-briller, håndspaltelampe, binokulært mikroskop eller andre hensigtsmæssige hjælpemidler. Efter registrering af observationerne i 24 timer kan øjnene undersøges yderligere med fluorescein.

Klassificeringen af øjenrespons er nødvendigvis subjektiv. For at give en mere ensartet klassificering af øjenresponset og for at bistå prøvningslaboratorieme og dem, som foretager og fortolker iagttagelserne, må iagttagelserne foretages af personer, som er tilstrækkeligt fortrolige med det anvendte score-system. Klassificeringen af øjenrespons foretages blindt.

2. **DATA**

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Score-værdierne for øjenirritation vurderes i tilknytning til læsionernes art, sværhedsgrad og reversibilitet eller manglende reversibilitet, De enkelte score-værdier repræsenterer ikke en absolut standard for et stofs irritationsfremkaldende egenskaber, da de også omfatter andre virkninger af teststoffet. I stedet må de enkelte score-værdier betragtes som vejledende værdier, som kun er meningsfulde, når de støttes af en fuldstændig beskrivelse og evaluering af alle observationer.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Rationale for in vivo-testning: weight-of-the-evidence-analyse af allerede foreliggende testdata, herunder resultater af den sekventielle testningsstrategi

— beskrivelse af relevante oplysninger fra foreliggende tidligere forsøg

— oplysninger afledt af de enkelte trin i testningsstrategien

— beskrivelse af udførte in vitro test med detaljeret beskrivelse af de anvendte metoder og resultater opnået med prøve- og referencestof

— beskrivelse af den udførte in vivo-undersøgelse af hudirritation/ætsning med angivelse af opnåede resultater

— weight-of-the-evidence-analyse med henblik på udførelse af in vivo-undersøgelse.

Prøvestof:

— identifikationsoplysninger (f.eks, CAS-nummer, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batch-nummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. pH, flygtighed, opløselighed, stabilitet, reaktion med vand)

— for blandinger, sammensætning og relativ procentdel af bestanddelene

— hvis et lokalanæstetikum benyttes, identifikation, renhed, art, dosis og potentiel interaktion med teststoffet.

Vehikel:

— identifikation, koncentration (i givet fald), anvendt volumen

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— anvendt art/stamme, rationale for anvendelse af andre dyr end albinokaniner

— hvert dyrs alder ved forsøgets begyndelse

— antal dyr af hvert køn i testgruppe og kontrolgruppe (hvis nødvendigt)

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse og slutning

— oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Resultater:

— beskrivelse af den anvendte metode til fastlæggelse af irritationsscore på hvert observationstidspunkt (f.eks. håndspaltelampe, binokulært mikroskop, fluorescein)

▼B

— angivelse i tabelform af irritations/ætsningsresponsdata for hvert dyr på hvert observationstidspunkt, indtil dyret ophører med forsøget

— forklarende beskrivelse af grad og art af den iagttagne irritation eller ætsning

— beskrivelse af alle andre iagttagne læsioner i øjet (f.eks. karindvækst, pannusdannelse, adhæsion, farvning)

— beskrivelse af ikke-okulære lokale og systemiske negative virkninger og eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultater.

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Resultaterne af øjenirritationsundersøgelser i laboratoriedyr kan kun i begrænset omfang overføres til mennesker. I mange tilfælde er albinokaniner mere følsomme end mennesker for øjenirriterende eller -ætsende stoffer.

Fortolkning af data skal ske med forbehold, så man undgår at medtage irritation forårsaget af sekundær infektion.

4. **HENVISNINGER**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, L., Giuliani, A. Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410- 429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies, ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19-26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483-524.

(6a) Forsøgsmetode B.40 Hudætsning.

(7) Forsøgsmetode B.4. Akut toksicitet: Hudirritation/ætsning.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Afholdt i Solna, Sverige, den 22.-24. januar 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtaget på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier, november 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

*Tabel I*

**KLASSIFICERING AF ØJENSKADER**

**Cornea**

Uklarhed: graden af uklarhed aflæses i det tætteste område (*)

| | |
|---|---|
| Ingen ulceration eller uklarhed | 0 |
| Spredte eller diffuse uklare områder (ikke bestående i en let mattering af den normale glans); detaljer i iris klart synlige | 1 |
| Let skelneligt halvgennemsigtigt område; detaljerne i iris let slørede | 2 |
| Område med perlemorsglans; ingen detaljer i iris synlige; pupilstørrelse kan knapt skelnes | 3 |
| Cornea uklar; iris ikke skelnelig gennem uklarheden | 4 |

Maksimum: 4

NOTER

(*) Området med corneauklarhed skal angives.

**Iris**

| | |
|---|---|
| Normal | 0 |
| Markant fordybede rugae, kongestion, hævelse, moderat hyperæmi omkring cornea; eller injektion; iris reagerer på lys (træg lysreaktion anses for en virkning) | 1 |
| Blødning, massiv ødelæggelse, eller ingen reaktion på lys | 2 |

Maksimum: 2

**Conjunctivae**

Rødme (af conjunctiva palpebrae og conjunctiva bulbi; bortset fra cornea og iris)

| | |
|---|---|
| Normal | 0 |
| Nogle blodkar hyperæmiske (injektion) | 1 |
| Diffus, blodrød farve; de enkelte kar ikke let skelnelige | 2 |
| Diffus oksekødsfarvet | 3 |

Maksimum: 3

**Chemosis**

Hævelse (om øjenlåg og/eller blinkhinder)

| | |
|---|---|
| Normal | 0 |
| Nogen unormal hævelse | 1 |
| Tydelig hævelse med delvis udkrængning af øjenlåg | 2 |
| Hævelse med øjenlåg omtrent halvt lukket | 3 |
| Hævelse med øjenlåg mere end halvt lukket | 4 |

Maksimum: 4

▼B

*BILAG*

**Sekventiel testningsstrategi for øjenirritation og ætsning**

**GENERELLE OVERVEJELSER**

Såvel hensynet til den videnskabelige kvalitet som til dyrenes velfærd taler for at undgå unødvendig brug af dyr og at minimere alle forsøg, som kan forventes at fremkalde svære reaktioner i dyr. Alle oplysninger om et stofs potentielle øjenætsende og irriterende egenskaber skal vurderes, før in vivo-testning overvejes. Der foreligger muligvis allerede tilstrækkelige vidnesbyrd til, at teststoffets potentiale for ætsning eller irritation af øjnene kan klassificeres, uden at der behøves laboratorieforsøg udført med dyr. Ved hjælp af weight-of-the-evidence-analyse og en sekventiel testningsstrategi kan behovet for in vivo-testning således nedsættes til et minimum, navnlig når stoffet forventes at fremkalde svære reaktioner.

Det anbefales, at de foreliggende oplysninger om stoffers øjenirriterende og ætsende egenskaber vurderes ved weight-of-the-evidence-analyse for at afgøre, om der ud over in vivo-øjenundersøgelser bør udføres supplerende undersøgelser til nærmere karakterisering af et sådant potentiale. Når yderligere undersøgelser er nødvendige, anbefales det at benytte den sekventielle testningsstrategi til fastlæggelse af de relevante forsøgsdata. For ikke tidligere testede stoffer anvendes den sekventielle testningsstrategi til at fastlægge det sæt data, som er nødvendigt til vurdering af stoffets potentiale for øjenirritation/ætsning. Den i dette bilag beskrevne testningsstrategi er udviklet på en OECD-workshop (1). Den er senere blevet bekræftet og udvidet i form af Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtoges på det 28, fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier i november 1998 (2).

Skønt denne sekventielle testning ikke indgår som en del af testmetode B.5, er det den anbefalede strategi til bestemmelse af øjenirritation/ætsning. Strategien repræsenterer både bedste praksis og en etisk standard for in vivo-testning af øjenirritation/ætsning. Testmetoden giver vejledning i udførelse af in vivo-forsøg og sammenfatter de faktorer, som bør tages i betragtning, før et sådant forsøg påbegyndes, Strategien tilvejebringer en metode til evaluering af foreliggende oplysninger om teststoffets øjenirriterende og ætsende egenskaber og en trinvis fremgangsmåde til at generere relevante data om stoffer, som har behov for yderligere undersøgelse eller ikke er blevet undersøgt, Strategien indebærer, at der først udføres validerede og anerkendte in vivo- eller ex vivo-test, og derefter forsøgsmetode B.4, hudirritation/ætsning, alt efter omstændighederne (3)(4).

**BESKRIVELSE AF DEN TRINVISE TESTNINGSSTRATEGI**

Før man iværksætter test som led i den sekventielle testningsstrategi (vist i figuren), skal alle foreliggende oplysninger vurderes for at afgøre nødvendigheden af in vivo-øjentest. Skønt vurdering af enkeltparametre (f.eks. ekstremt pH) i sig selv kan tænkes at give væsentlige oplysninger, må alle de foreliggende oplysninger betragtes under ét, Som grundlag for en afgørelse baseret på weight-of-the-evidence må alle relevante oplysninger om virkningerne af det pågældende stof og af analoge stoffer evalueres, og et rationale for afgørelsen fremlægges. Primært må foreliggende oplysninger om stoffets virkning på dyr og mennesker tillægges vægt, efterfulgt af resultaterne af in vivo. eller ex vivo-testning. Når det på nogen måde er muligt, bør in vivo-undersøgelser af ætsende stoffer undgås. I testningsstrategien bør følgende faktorer tages i betragtning;

▼B

*Vurdering af foreliggende data fra mennesker og dyr (trin 1).* Foreliggende data fra mennesker, f.eks. kliniske undersøgelser eller arbejdsmiljøundersøgelser, case-undersøgelser og/eller data fra dyreforsøg fra f.eks. øjenstudier skal primært tages i betragtning, da de giver oplysninger direkte vedrørende virkninger på øjnene. Derefter vurderes foreliggende data fra undersøgelser af hudætsning/irritation i mennesker og/eller dyr. Stoffer med kendt ætsende eller irriterende virkning på øjet bør ikke instilleres i øjenene på dyr, hvilket ligeledes gælder stoffer, som virker ætsende eller irriterende på huden, da disse må anses for at virke ætsende og/eller irriterende også på øjnene. Stoffer, for hvilke der foreligger tilstrækkelig dokumentation for manglende ætsende og irriterende virkning fra tidligere øjenstudier, bør heller ikke testes i in vivo-øjenstudier.

*Analyse af struktur/aktivitetrelationer (trin 2).* Resultater fra eventuelle undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer skal tages i betragtning, Når der for strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer foreligger tilstrækkelige data fra mennesker og/eller dyr til at bestemme deres potentiale for ætsning/irritation af øjnene, kan teststoffet antages at ville frembringe samme responser. I sådanne tilfælde behøver teststoffet ikke nødvendigvis testes. Negative data fra undersøgelser af strukturelt beslægtede stoffer eller blandinger af sådanne stoffer udgør ikke tilstrækkeligt bevis for fravær af ætsende eller irriterende egenskaber af et stof i den sekventielle testningsstrategi. Potentialet for ætsende og og irriterende virkning på både hud og øje bør fastlægges ved validerede og anerkendte metoder til analyse af struktur/aktivitetrelationer.

*Fysisk-kemiske og kemisk reaktivitet (trin 3).* Stoffer, som udviser ekstremt pH som ≤ 2,0 eller ≤ 11,5, kan have stærke lokal virkninger. Hvis et ekstremt pH er grundlaget for at udpege et stof som ætsende eller irriterende for øjnene, kan også dets syre/basereserve (eller bufferkapacitet) tages i betragtning (5)(6). Tyder stoffets bufferkapacitet på, at det muligvis ikke virker ætsende på øjnene, bør dette bekræftes ved videre testning, fortrinsvis med brug af en valideret og anerkendt in vitro- eller ex vivo-test (jf, trin 5 og 6).

*Hensyntagen til andre foreliggende oplysninger (trin 4).* Alle foreliggende oplysninger om systemisk toksicitet ved påføring på huden vurderes på dette trin. Teststoffets akutte toksicitet ved optagelse gennem huden skal ligeledes tages i betragtning. Er teststoffet påvist at være meget toksisk ved optagelse gennem huden, behøver det ikke nødvendigvis testes i øjenene. Skønt der ikke nødvendigvis er sammenhæng mellem akut toksicitet ved optagelse gennem huden og øjenirritation/ætsning, kan man gå ud fra, at når et agens er meget toksisk ved optagelse gennem huden, vil det ligeledes vise sig meget toksisk ved instillation i øjet. Sådanne oplysninger kan ligeledes tages i betragtning mellem trin 2 og 3.

*Resultater af in vitro- eller ex vivo-undersøgelser (trin 5 og 6).* Stoffer, som har udvist ætsende eller stærkt irriterende egenskaber i en in vitro- eller ex vivo-undersøgelse (7)(8), som er valideret og anerkendt specielt til vurdering af ætsende/irriterende virkning på øjne eller hud, behøver ikke testes i dyreforsøg. Sådanne stoffer må antages at ville frembringe tilsvarende svære virkninger in vivo. Foreligger der ikke validerede og anerkendte in vitro- og/eller ex vivo-test, springes trin 5 og 6 over og fortsættes direkte med trin 7.

*Vurdering af stoffets hudirriterende eller ætsende virkning in vivo (trin 7).* Når ovennævnte undersøgelser ikke udgør tilstrækkelig dokumentation til at foretage en konklusiv weight-of-the-evidence-analyse af et stofs potentielle irriterende/ætsende virkning på øjet, bestemmer man først dets potentiale for in vivo-hudirritation/ætsning ved hjælp af forsøgsmetode B.4 (4) og det tilhørende bilag (9). Er stoffet påvist at forårsage ætsning eller svær hudirritation, bør det anses for øjenætsende, medmindre andre oplysninger taler for en anden konklusion. Der behøver således ikke foretages nogen in vivo-øjentest. Er stoffet ikke ætsende eller ikke stærkt hudirriterende, udføres en in vivo-øjentest.

▼B

*In vivo-test i kaniner (trin 8 og 9).* In vivo-øjentestning bør begynde med en indledende test i ét dyr. Viser stoffet sig i denne test ætsende eller stærkt irriterende på øjet, bør yderligere test ikke udføres. Viser testen ingen ætsende eller ingen stærkt irriterende virkninger, udføres en verifikationstest i yderligere to dyr.

**HENVISNINGER**

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Afholdt i Solna, Sverige, den 22.-24. januar 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, som vedtaget på det 28. fælles møde mellem OECD's kemikalieudvalg og arbejdsgruppe vedrørende kemikalier, november 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies, ATLA 27, 161-177.

(4) Forsøgsmetode B.4. Akut toksicitet: hudirritation/ætsning.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19-26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol, 12, 227-231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483-524.

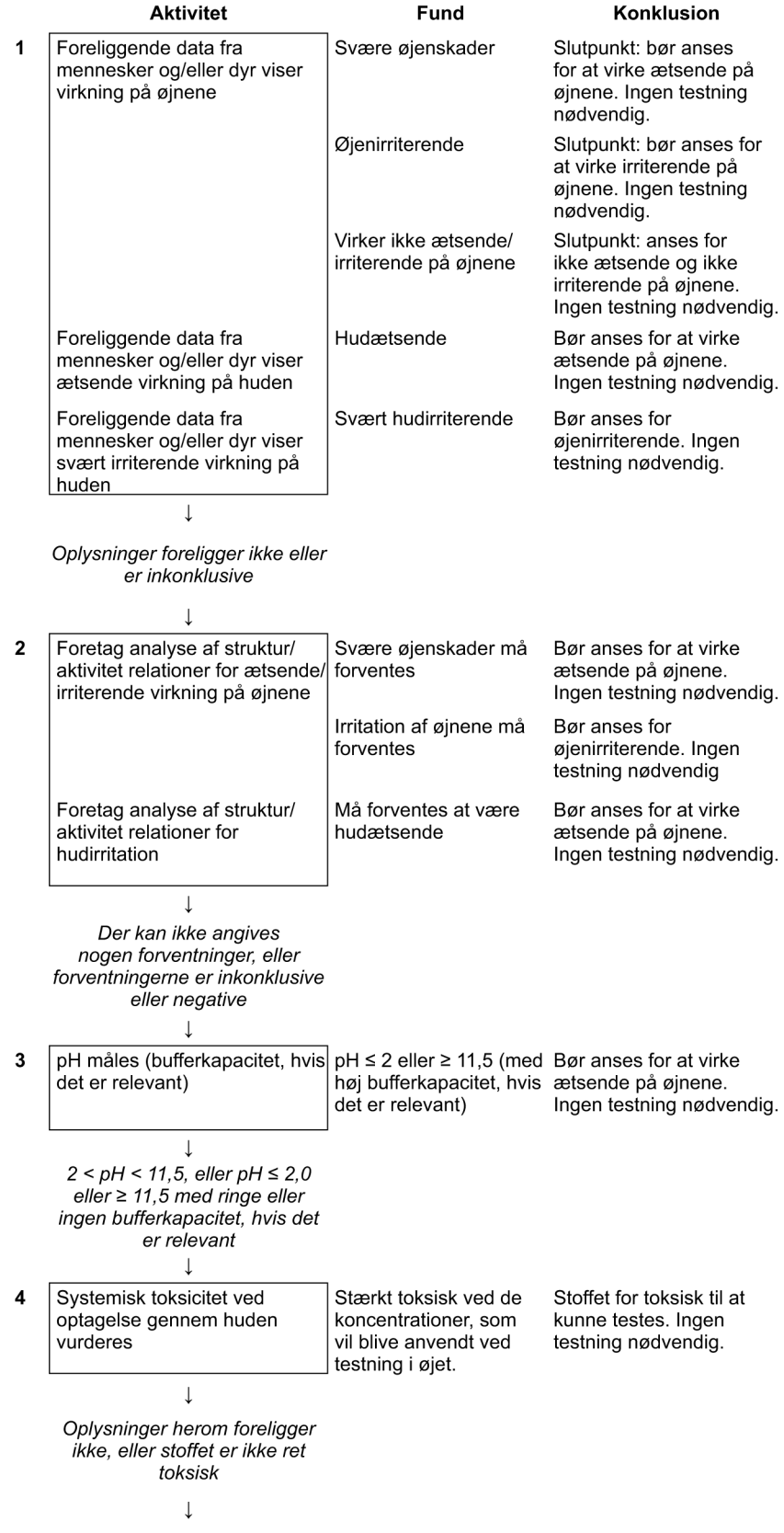
(8) Forsøgsmetode B.40 Hudætsning.

(9) Bilag til forsøgsmetode B.4: Sekventiel testningsstrategi for hudirritation og ætsning.

▼B

*Figur*

**En strategi for testning og vurdering af øjenirritation/ætsning**



▼B

| | | | |
|---|---|---|---|
| **5** | Der udføres en valideret og anerkendt *in vitro*- eller *ex vivo-test* for ætsende virkning på øjnene | Ætsningsrespons | Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere testning nødvendig. |
| | ↓ | | |
| | *Stoffet er ikke ætsende, eller der foreligger endnu ikke validerede* in vitro- *eller* ex vivo-testmetoder *for ætsende virkning på øjnene* | | |
| | ↓ | | |
| **6** | Der udføres en valideret og anerkendt *in vitro*- eller *ex vivo-test* for øjenirritation | Irritationsrespons | Bør anses for øjenirriterende. Ingen yderligere testning nødvendig. |
| | ↓ | | |
| | *Stoffet er ikke ætsende, eller der foreligger endnu ikke validerede* in vitro- *eller* ex vivo-testmetoder *for irriterende virkning på øjnene* | | |
| | ↓ | | |
| **7** | Potentialet for *in vivo-hudirritation/* ætsning bestemmes eksperimentelt (se forsøgsmetode B.4 og tilhørende bilag) | Ætsnings- eller svær irritationsrespons | Bør anses for at virke ætsende på øjnene. Ingen yderligere testning nødvendig. |
| | ↓ | | |
| | *Stoffet virker ikke ætsende eller stærkt irriterende på huden* | | |
| | ↓ | | |
| **8** | Der udføres en indledende *in vivo*-kaninøjentest i ét dyr | Svære øjenskader | Bør anses for at virke ætsende på øjnene, Ingen yderligere testning nødvendig. |
| | ↓ | | |
| | *Ingen svær skade, eller ingen respons* | | |
| | ↓ | | |
| **9** | Der udføres en verifikationstest i yderligere ét eller to dyr | Ætsende eller irriterende | Bør anses for ætsende eller irriterende for øjnene. Ingen yderligere testning nødvendig |
| | | Ikke ætsende eller irriterende | Bør anses for ikke irriterende og ikke ætsende for øjnene. Ingen yderligere testning nødvendig. |

▼B

B.6. **HUDSENSIBILISERING**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

*Bemærkninger:*

I et system for klassifikation af den toksicitet, der er relevant for folkesundheden, er det af stor betydning at have følsomme test, som kan afsløre stoffer, der kan virke hudsensibiliserende på mennesker.

Der findes ikke én enkelt testmetode, hvorved man med sikkerhed kan identificere alle stoffer, som kan virke hudsensibiliserende på mennesker, og som kan anvendes til alle stoffer.

Der skal ved valg af test tages hensyn til en række faktorer såsom stoffets fysiske egenskaber, herunder dets evne til at trænge gennem huden.

Der er udviklet to testtyper med anvendelse af marsvin: adjuvanstypen, hvor en allergisk tilstand forstærkes, når teststoffet opløses eller opslæmmes i Freunds komplette adjuvans (FCA), og typen uden adjuvans.

Test af adjuvanstypen vil normalt forudsige et stofs sandsynlige hudsensibiliserende virkning hos mennesker mere præcist end de metoder, hvor der ikke benyttes Freunds komplette adjuvans, og bliver derfor foretrukket.

Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT) er en meget anvendt test af adjuvanstypen. Skønt en række andre metoder kan benyttes til at undersøge et stofs potentielle hudsensibiliserende virkning, er GPMT den foretrukne metode af adjuvanstypen.

Test uden adjuvans (hvor Buehlertesten er den foretrukne) bliver for mange kemiske stofgrupper anset for at være mindre følsom.

Der kan i visse tilfælde, være gode grunde til at vælge Buehlertesten med lokal påføring i stedet for den intradermale injektion, der benyttes i maksimeringstesten på marsvin. Der skal gives en videnskabelig begrundelse for anvendelse af Buehlertesten.

I denne metode beskrives maksimeringstesten på marsvin (GPMT) og Buehlertesten. Der kan anvendes andre metoder, forudsat at de er tilstrækkeligt validerede, og at valget er videnskabeligt begrundet.

Hvis testresultatet i en af de anerkendte screeningstest er positivt, er det tilladt at betegne stoffet som potentielt sensibiliserende og det er måske ikke nødvendigt at udføre yderligere marsvineforsøg. Hvis stoffet er negativt i en af de anerkendte screeningsmetoder, skal der udføres en marsvinetest, hvor der bruges de fremgangsmåder, der er beskrevet i denne testmetode.

Se også den generelle indledning til del B.

▼B

1.2. DEFINITIONER

*Hudsensibilisering*: (allergisk kontaktdermatitis) er en immunologisk hudreaktion på et stof. Hos mennesker kan reaktionerne være karakteriseret ved kløen, erytem, ødem, papler, vesikler, blærer eller en kombination heraf. Andre arter kan have andre reaktioner f.eks. kun erytem og ødem.

*Induktionseksponering*: eksperimentel eksponering af et individ for et teststof med henblik på fremkaldelse af hypersensibel tilstand.

*Induktionsperiode*: tidsrum på mindst en uge efter en induktionseksponering, under hvilken en hypersensibel tilstand kan være opstået.

*Provokationseksponering*: eksperimentel eksponering — efter en induktionsperiode — af et tidligere behandlet individ for et teststof til konstatering af, om individet reagerer hypersensibelt.

1.3. REFERENCESTOFFER

Den anvendte forsøgsmetodes følsomhed og pålidelighed vurderes hver sjette måned med anvendelse af stoffer, der vides at have mildt til moderat hudsensibiliserende egenskaber.

I en velgennemført test bør der for mildt/moderat sensibiliserende stoffer ventes en reaktion på mindst 30 % i en adjuvanstest og mindst 15 % i en test uden adjuvans.

Følgende stoffer foretrækkes:

| CAS-nummer | Einecs-nummer | Einecs-navn | Fælles navn |
|---|---|---|---|
| 101-86-0 | 202-983-3 | α-hexylkanelaldehyd | α-hexylkanelaldehyd |
| 149-30-4 | 205-736-8 | benzothiazol-2-thiol (mercaptobenzothiazol) | kaptax |
| 94-09-7 | 202-303-5 | benzocain | norcain |

Under visse omstændigheder vil andre kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Forsøgsdyrene udsættes først for teststoffet med intradermale injektioner og/eller epidermal applikation (induktionseksponering). Efter en hvileperiode på 10-14 dage (induktionsperiode), hvor der kan udvikle sig immunrespons, udsættes dyrene for en provokationsdosis. Omfanget og graden af hudens reaktion på provokationseksponeringen i forsøgsdyrene sammenlignes med resultater fra kontroldyr, der har fået placebo-behandling i induktionsperioden og dernæst er eksponeret for provokationsdosis.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODERNE

Hvis det anses for nødvendigt at fjerne teststoffet, bør dette gøres med vand eller et passende opløsningsmiddel, uden at den fremkaldte reaktion ændres eller overhuden beskadiges.

▼B

1.5.1. *Maksimeringstest på marsvin (Guinea-Pig Maximization Test — GPMT)*

1.5.1.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøgets afslutning.

1.5.1.2. Forsøgsbetingelser

1.5.1.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.1.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst ti dyr og kontrolgruppen af mindst fem dyr. Hvis der anvendtes mindre end tyve forsøgsmarsvin og ti kontrolmarsvin og det ikke er muligt at konkludere, at teststoffet er sensibiliserende, anbefales det stærkt at teste stoffet i yderligere dyr, så der i alt er tale om mindst tyve forsøgsdyr og ti kontroldyr.

1.5.1.2.3. Dosisniveauer

Den koncentration af teststoffet, der anvendes ved hver induktionseksponertng, må ikke forårsage systemiske gener og skal være den størst mulige, der forårsager mild til moderat hudirritation. Provokationskoncentrationen skal være den størst mulige, der ikke femkalder hudirritation. Hvis nødvendigt kan de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr. Det bør overvejes at bruge FCA-behand! ede dyr til dette formål.

1.5.1.3. Fremgangsmåde

1.5.1.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis i skulderpartiet — hvorfra hårlaget er fjernet — således, at hvert injektionspar består af en injektion på hver side af midterlinjen.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/-vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: teststoffet i et passende vehikel i den udvalgte koncentration.

Injektion 3: teststoffet i den valgte koncentration i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

I injektion 3 opløses vandopløselige stoffer i vandfasen før de blandes med FCA. Fedtopløselige eller uopløselige stoffer opslæmmes i FCA forud for blanding med den vandige fase. Teststoffets slutkoncentration skal være den samme som i injektion 2.

▼B

Injektion 1 og 2 placeres tæt på hinanden og nærmest ved hovedet, mens injektion 3 placeres i den bageste del af testområdet.

Dag 0 — kontrolgruppe

Tre intradermale injektioner på 0,1 ml gives parvis på samme måde som for forsøgsdyrene.

Injektion 1: en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Injektion 2: det ufortyndede vehikel.

Injektion 3: en 50 vægtprocent formulering af vehiklet i en blanding i forholdet 1:1 (volumenprocent) af FCA/vand eller fysiologisk saltopløsning.

Dag 5-7 — forsøgsgruppe og kontrolgruppe

Hvis stoffet ikke er hudirriterende, fremkaldes der, ca. 24 timer inden den lokale induktionsapplikation, en lokal irritation ved behandling af testområdet med 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfat i vaseline, efter klipning og/eller barbering.

Dag 6-8 — forsøgsgruppe

Testområdet klippes. Et stykke filtrerpapir (2 × 4 cm) gennemvædes med teststoffet, der er blandet med et passende vehikel, og anbringes på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer. Valget af vehikel skal begrundes. Faste stoffer pulveriseres og inkorporeres i et passende vehikel. Væske kan eventuelt anvendes direkte.

Dag 6-8 — kontrolgruppe

Testområdet klippes. Vehikel alene anbringes på tilsvarende måde på testområdet og fastholdes med en okklusiv forbinding i 48 timer.

1.5.1.3.2. Provokation

Dag 20-22 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrenes flanke for hår. På forsøgsdyrenes ene side anbringes en lap eller en kapsel med teststoffet, og, hvis det er relevant, kan der også anbringes en lap eller en kapsel med rent vehikel på den anden side. Lapperne holdes i kontakt med huden i 24 timer med en okklusiv forbinding.

1.5.1.3.3. Observation og scoring: forsøgs- og kontrolgruppe

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, renses provokationsområdet og befries om nødvendigt for hår

— ca. 3 timer senere (ca. 48 timer efter påføring af provokationsdosis) observeres hudens reaktion, som registreres efter den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter denne observation foretages endnu en observation (72 timer), som registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendige at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. 1 uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

▼B

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnusson/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

1.5.2. *Buehlertest*

1.5.2.1. Forberedelser

Unge, sunde, kønsmodne albinomarsvin tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage forud for testen. Før forsøget begyndes, fordeles dyrene randomiseret i behandlingsgrupper. Behåring fjernes ved klipning, barbering eller eventuelt med kemiske midler, afhængigt af testmetode. Huden må ikke irriteres. Dyrene vejes, inden forsøget påbegyndes, og ved forsøgets afslutning.

1.5.2.2. Forsøgsbetingelser

1.5.2.2.1. Forsøgsdyr

Der benyttes albinomarsvin af almindeligt anvendte stammer.

1.5.2.2.2. Antal og køn

Der kan anvendes handyr og/eller hundyr. Hvis der benyttes hundyr, må de ikke have født, og de må ikke være drægtige.

Forsøgsgruppen skal bestå af mindst 20 dyr og kontrolgruppen af mindst 10 dyr.

1.5.2.2.3. Dosisniveauer

Der vælges en så høj koncentration af teststoffet for hver induktionseksponering, at der fremkaldes en mild, men ikke overdreven irritation. Provokationskoncentrationen bør være den størst mulige, der ikke fremkalder irritation. Hvis nødvendigt kan de relevante koncentrationer bestemmes ved hjælp af en pilotundersøgelse med to eller tre dyr.

For vandopløselige teststoffer kan der som vehikel bruges vand eller en fortyndet, ikke-irriterende opløsning af et overfladeaktivt stof. For andre teststoffer foretrækkes 80 % ethanol/vand til induktionseksponering og acetone til provokationseksponering.

1.5.2.3. Fremgangsmåde

1.5.2.3.1. Induktion

Dag 0 — forsøgsgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Testlappesystemet skal være gennemvædet med teststoffet i et egnet vehikel (valg af vehikel skal begrundes; væsker kan eventuelt anvendes direkte).

Testlappesystemet anbringes på testområdet og fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer.

▼B

Testlappesystemet skal være okklusivt. Et stykke gaze er passende: det kan være rundt eller firkantet, af en størrelse på ca. 4-6 $cm^2$. For at sikre okklusion foretrækkes det, at dyrenes bevægelsesfrihed begrænses med passende midler. Hvis der anvendes bandage, kan yderligere eksponering være nødvendig.

Dag 0 — kontrolgruppe

Dyrene befries for hår (klippes tæt) på den ene flanke. Vehiklet alene anbringes på testområdet på tilsvarende måde som for forsøgsgruppen. Testlappesystemet fastholdes i kontakt med huden med en okklusiv lap eller kapsel og en passende forbinding i seks timer. Hvis det kan påvises, at der ikke er behov for en placebo-kontrolgruppe, kan en ikke forud testet kontrolgruppe (naive control group) bruges.

Dag 6-8 og 13-15 — forsøgs- og kontrolgruppen

På dag 6-8 og igen på dag 13-15 foretages samme påføring som på dag 0 på samme testområde (om nødvendigt befriet for hår).

1.5.2.3.2. Provokation

Dag 27-29 — forsøgs- og kontrolgruppe

Både i forsøgsgruppen og i kontrolgruppen befries dyrene for hår (klippes tæt) på den anden flanke. Bagest på flanken på forsøgs- og kontroldyrene anbringes en okklusiv lap eller kapsel med en passende mængde teststof i den højest mulige koncentration, der ikke fremkalder irritation.

Hvis det er relevant, anbringes desuden en okklusiv lap eller kapsel med vehikel alene forrest på flanken på såvel forsøgs- som kontroldyr. Lapper og kapsler fastholdes i kontakt med huden med en passende forbinding i seks timer.

1.5.2.3.3. Observation og scoring

— ca. 21 timer efter at lappen er fjernet, befries provokationsområdet for hår

— ca. tre timer senere (ca. 30 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktion, og denne registreres i henhold til den scoringsskala, der er vist i tillægget

— ca. 24 timer efter observationen efter 30 timer (dvs. 54 timer efter påføring af provokationslap) observeres hudens reaktioner igen og registreres.

Blindlæsning af forsøgs- og kontroldyrene anbefales.

Hvis det er nødvendigt at uddybe resultaterne af den første provokationseksponering, bør det overvejes at foretage endnu en provokationseksponering (dvs. en fornyet provokation), eventuelt med en ny kontrolgruppe, ca. en uge efter den første eksponering. En fornyet provokation kan også foretages på den oprindelige kontrolgruppe.

▼B

Alle hudreaktioner og alle usædvanlige virkninger, herunder systemiske reaktioner, af både induktions- og provokationseksponeringen skal observeres og registreres i henhold til Magnussen/Kligmans scoringsskala (se tillægget). Andre teknikker, f.eks. histopatologisk undersøgelse og måling af hudfortykkelse, kan benyttes til afklaring af tvetydige reaktioner.

2. **DATA (GPMT og Buehlertest)**

Data opstilles i tabelform, som angiver hudens reaktion ved hver enkelt observation af hver enkelt dyr.

3. **RAPPORTERING (GPMT og Buehlertest)**

Hvis der udføres en screeningtest inden marsvinetesten, skal der sammen med de resultater, der er opnået med test- og referencestofferne, gives en beskrivelse af eller henvisning til testen (f.eks. Mouse Ear Swelling Test (MEST)), herunder oplysninger om fremgangsmåde.

**Forsøgsrapport (GPMT og Buehlertest)**

Forsøgsrapporten skal om muligt indholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt marsvinestamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, laboratoriemiljø, foder osv.

— hver enkelt dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

Forsøgsbetingelser:

— metode til forberedelse af stedet for anbringelse af lap

— oplysninger om anvendte lapmaterialer og metode til anbringelse af lapper

— resultat af forundersøgelse med konklusioner om de induktions- og provokationskoncentrationer, der skal anvendes i testen

— oplysninger om teststoffets tilberedning, påføring og fjernelse

— begrundelse for valg af vehikel

— de vehikel- og teststofkoncentrationer, der er anvendt til induktions- og provokationseksponering, og den samlede mængde stof, der er anvendt til induktion og provokation.

Resultater:

— resumé af resultaterne af den seneste følsomheds- og pålidelighedskontrol (jf. 1.3), herunder oplysninger om anvendt stof, koncentration og vehikel

▼B

— oplysninger om observationerne af hver enkelt dyr, herunder scoringssystem

— beskrivende redegørelse for de observerede virkningers art og styrke

— eventuelle histopatologiske fund.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 406 fra OECD.

▼B

*Tillæg*

*TABEL*

**Magnusson/Kligmans scoringsskala til vurdering af reaktionerne på provokationslappetest**

0 = ingen synlig forandring

1 = afgrænset eller pletvis erytem

2 = moderat og sammenflydende erytem

3 = kraftigt erytem og hævelse.

▼M4

## B.7. TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, ORAL) HOS GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 407 (2008). Den oprindelige Test Guideline 407 blev vedtaget i 1981. I 1995 blev en revideret udgave vedtaget med henblik på at indhente flere informationer fra de anvendte forsøgsdyr, navnlig om neurotoksicitet og immunotoksicitet.

2. I 1998 indledte OECD en højtprioriteret aktivitet, der havde til formål at revidere de eksisterende Test Guidelines og udvikle nye Test Guidelines for screening og test af potentielle hormonforstyrrende stoffer (8). Et element af denne aktivitet var at opdatere de eksisterende OECD-retningslinjer for »toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, oral) hos gnavere« (TG 407) med parametre, der kunne bruges til at påvise testkemikaliers hormonforstyrrende aktiviteter. Denne fremgangsmåde blev underkastet et omfattende internationalt program, som omfattede test af relevansen og anvendeligheden af de yderligere parametre, disse parametres effektivitet for kemikalier med (anti)østrogen, (anti)androgen og (anti)thyreoid aktivitet samt reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og de nye parametres interferens med de parametre, der krævedes i henhold til den tidligere TG 407. Den store datamængde, der blev indhentet herved, er samlet og evalueret i detaljer i en omfattende OECD-rapport (9). Denne opdaterede testmetode B.7 (svarende til TG 407) er resultatet af de erfaringer og resultater, der er opnået i løbet af det internationale testprogram. Denne testmetode gør det muligt at placere visse virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer i sammenhæng med andre toksiske virkninger.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

3. Efter at en akut toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Denne testmetode har til formål at undersøge virkningerne på en meget bred vifte af potentielle mål for toksicitet. Den skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen eksponering i en relativt begrænset periode, herunder virkninger på nervesystemet, immunsystemet og det endokrine system. Med hensyn til disse effektparametre tager metoden sigte på at identificere kemikalier med neurotoksisk potentiale, som i givet fald bør undersøges nøjere, og kemikalier, der påvirker skjoldbruskkirtlens fysiologi. Den kan også tilvejebringe data om kemikalier, der påvirker mandlige og/eller kvindelige kønsorganer hos unge voksne dyr, og kan give en indikation af de immunologiske effekter.

4. Resultaterne af denne testmetode B.7 bør anvendes til fareidentifikation og risikovurdering. De resultater, der fås ved hjælp af de endokrinrelaterede parametre, bør ses i sammenhæng med »OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (11). Metoden omfatter det grundlæggende forsøg vedrørende toksicitet ved gentagen dosering, der kan bruges til kemikalier, for hvilke et 90-dages forsøg ikke er berettiget (f.eks. når produktionsmængden ikke overstiger visse grænser), eller som et forforsøg forud for et langtidsforsøg. Eksponeringsvarigheden bør være 28 dage.

▼M4

5. Det internationale program, der blev gennemført med henblik på at validere parametre, der kan bruges til at påvise et testkemikalies potentielle hormonforstyrrende aktivitet, viste, at kvaliteten af de data, der indhentes ved hjælp af denne testmetode B.7, i høj grad afhænger af testlaboratoriets erfaring. Dette gælder specifikt for den histopatologiske bestemmelse af cykliske forandringer i de kvindelige kønsorganer og for bestemmelsen af vægten af de små hormonafhængige organer, der er vanskelige at dissekere. Der er udarbejdet vejledning om histopatologi (19). Den findes på OECD's offentlige websted for »Test Guidelines«. Den har til formål at hjælpe patologer i deres undersøgelser og øge testens sensitivitet. En lang række parametre blev vurderet at være indikative for endokrinrelateret toksicitet og er medtaget i testmetoden. Parametre, for hvilke der ikke forelå tilstrækkelige data til at påvise anvendelighed, eller som kun gav svage beviser i valideringsprogrammet på deres evne til at hjælpe med at påvise hormonforstyrrende stoffer, foreslås som valgfrie effektparametre (se tillæg 2).

6. På grundlag af data genereret i valideringsprocessen skal det understreges, at testens sensitivitet ikke er tilstrækkelig til at identificere alle stoffer med (anti)androgene eller (anti)østrogene virkemåder (9). Testen anvendes ikke i en livsfase, der er mest sensitiv over for hormonforstyrrelser. Ved hjælp af testmetoden blev der dog i løbet af valideringsprocesserne identificeret stoffer, som svagt og stærkt påvirker skjoldbruskkirtlens funktion, og stærkt og moderat hormonforstyrrende stoffer, der virker gennem østrogene eller androgene receptorer, men i de fleste tilfælde blev der ikke identificeret hormonforstyrrende stoffer, som svagt påvirker østrogene eller androgene receptorer. Den kan derfor ikke beskrives som en test til screening af hormonforstyrrende aktivitet.

7. Manglen på virkninger med tilknytning til disse virkemåder kan derfor ikke antages at være bevis for manglende virkning på det endokrine system. Hvad angår virkninger fremkaldt af hormonforstyrrende stoffer, bør stofkarakterisering derfor ikke alene baseres på resultaterne af denne testmetode, men bør anvendes i en »weight of evidence«-tilgang, der bruger alle eksisterende data om et kemikalie til at karakterisere potentiel hormonforstyrrende aktivitet. Myndigheders afgørelser vedrørende hormonforstyrrende aktivitet (stofkarakterisering) bør derfor baseres på en bred tilgang og ikke alene resultaterne af anvendelsen af denne testmetode.

8. Det anerkendes, at alle dyreforsøg skal overholde lokale standarder for dyrepleje. De anførte beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og tilsidesættes af evt. strengere lokale bestemmelser. Nærmere anvisninger i human behandling af dyr findes i OECD (14).

9. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

10. Testkemikaliet administreres oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 28 dage. I eksponeringsperioden observeres dyrene hver dag omhyggeligt for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning. Et 28-dages forsøg tilvejebringer informationer om virkningerne af gentagen oral eksponering og kan angive behovet for yderligere forsøg med længere varighed. Det kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der

▼M4

skal vælges til forsøg med længere varighed. Data, der udledes ved hjælp af testmetoden, bør kunne anvendes til at karakterisere testkemikaliets toksicitet, indikere dosis-responsforholdet og bestemme det laveste dosisniveau (NOAEL).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

11. Rotten er den foretrukne gnaverart, selv om andre gnaverarter kan anvendes. Hvis de parametre, der er anført i denne testmetode B.7, undersøges hos andre gnaverarter, gives en detaljeret begrundelse. Selv om det er biologisk plausibelt, at andre arter reagerer på giftstoffer på næsten samme måde som rotter, kan brugen af mindre arter resultere i øget variabilitet som følge af de tekniske udfordringer, der er forbundet med dissekering af små organer. I det internationale valideringsprogram til påvisning af hormonforstyrrende stoffer var rotter den eneste anvendte art. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Doseringen bør begynde snarest muligt efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnittet for hvert køn. Hvis et forsøg med gentagen oral dosis gennemføres som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør der så vidt muligt anvendes dyr fra samme stamme og herkomst i begge forsøg.

**Opbevaring og fodring**

12. Alle fremgangsmåder skal overholde lokale standarder for pleje af forsøgsdyr. Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke være over 70 %, hvilket dog ikke gælder under rengøring af lokalet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet, når denne administrationsmåde anvendes. Dyrene bør anbringes i bure med små grupper af samme køn. Dyrene kan anbringes enkeltvis, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis flere dyr anbringes i samme bur, bør der højst være fem dyr pr. bur.

13. Foderet analyseres regelmæssigt for forurenende stoffer. En prøve af foderet opbevares, indtil rapporten er udarbejdet.

**Forberedelse af dyrene**

14. Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden behandlingsforsøget påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

**Fremstilling af doser**

15. Testkemikaliet indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Den orale administrationsmetode afhænger af forsøgets formål og testkemikaliets fysiske/kemiske/toksikokinetiske egenskaber.

▼M4

16. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes.

FREMGANGSMÅDE

**Dyrenes antal og køn**

17. Der anvendes mindst 10 dyr (5 hunner og 5 hanner) ved hvert dosisniveau. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør det oprindelige antal forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Det kan overvejes at udsætte en yderligere satellitgruppe på 10 dyr (5 af hvert køn) i kontrolgruppen og i gruppen med den højeste dosis, således at man kan observere evt. reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen.

**Dosering**

18. Generelt skal der anvendes mindst tre testgrupper og en kontrolgruppe, men hvis andre data ikke giver anledning til at forvente virkning af en dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, kan en grænsetest udføres. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres et dosisbestemmende forsøg (»range finding«) (dyr af samme stamme og herkomst) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis.

19. Dosisniveauerne udvælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende data om testkemikaliet eller beslægtede kemikaliers toksicitet og (toksiko)kinetik. Den højeste dosis vælges med henblik på fremkaldelse af toksiske effekter, men ikke død eller alvorlig lidelse. Normalt vælges en faldende række dosisniveauer til påvisning af eventuelt dosisafhængigt respons og niveau, hvor skadelige effekter ikke kan observeres ved det laveste dosisniveau (NOAEL). Det optimale interval mellem to doser er ofte en faktor på 2-4, og tilføjelse af en fjerde forsøgsgruppe er ofte at foretrække frem for anvendelse af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 10) mellem dosisniveauerne.

20. Hvis der observeres generel toksicitet (f.eks. reduceret kropsvægt, virkninger på lever, hjerte, lunger eller nyrer osv.) eller andre forandringer, der eventuelt ikke er toksiske virkninger (f.eks. reduceret indtagelse af føde eller forstørret lever), bør de observerede virkninger på de immonologiske, neurologiske eller endokrine effektparametre fortolkes med forsigtighed.

**Grænsetest**

21. Hvis en test med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag eller, ved administration gennem foder eller drikkevand, en tilsvarende procentdel i foderet eller drikkevandet (baseret på bestemmelse af kropsvægten), udført efter nedenstående fremgangsmåde, ikke fremkalder erkendbare toksiske virkninger, og hvis der ikke på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer kan ventes toksiske virkninger, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

▼M4

**Administration af doser**

22. Dyrene får testkemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 28 dage. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis forstærkes ved højere koncentration, skal variation af testvolumenet minimeres ved at justere koncentrationen, så volumenet er konstant ved alle dosisniveauer.

23. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Ved administration af testkemikaliet i foderet kan det enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; den anvendte mulighed skal specificeres. Ved administration med sonde skal dosis gives på tilsvarende tidspunkt hver dag og efter behov justeres, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Hvis et forsøg med gentagen dosis anvendes som et forforsøg forud for et langtidsforsøg, bør foderet være det samme i begge forsøg.

**Observationer**

24. Observationsperioden varer 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i mindst 14 dage uden indgift af testkemikalie, således at det kan registreres, om der er forsinkede, vedvarende eller reversible toksiske virkninger.

25. Der foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, om muligt på det eller de samme tidspunkter hver dag og under hensyntagen til, hvornår de forventede virkninger efter dosering er stærkest. Dyrenes sundhedstilstand registreres. Dyrene observeres for morbiditet og mortalitet mindst to gange om dagen.

26. Én gang før den første eksponering (med henblik på individbaserede sammenligninger) og mindst én gang om ugen derefter foretages der indgående kliniske observationer af alle dyrene. Med henblik på disse observationer tages dyrene ud af deres egne bure og anbringes i et standardindelukke. Observationerne udføres om muligt på samme tidspunkt hver gang. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at testbetingelserne varierer minimalt, og at observationerne om muligt foretages af observatører, der ikke har kendskab til behandlingen. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (2).

27. I den fjerde eksponeringsuge vurderes reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (2) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (3) (4) (5), gribestyrke og motorisk aktivitet (7). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid anvendes.

▼M4

28. Funktionelle observationer i den fjerde eksponeringsuge kan udelades, hvis forsøget gennemføres som et forforsøg til et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet (90 dage). I så fald medtages de funktionelle observationer i det opfølgende forsøg. På den anden side kan data vedrørende funktionelle observationer fra forsøget med gentagen dosis lette valget af dosisniveauer for et efterfølgende forsøg vedrørende subkronisk toksicitet.

29. Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på toksicitet i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

30. Ved obduktion kan brunstcyklus for alle hundyr bestemmes (frivilligt) ved at tage vaginalt smear. Disse observationer skaffer viden om brunstcyklusfasen på aflivningstidspunktet og bidrager til den histologiske evaluering af østrogenfølsomt væv [se vejledning om histopatologi (19)].

**Kropsvægt og foder-/vandindtagelse**

31. Alle dyr skal vejes mindst én gang ugentlig. Mængden af foderindtagelse skal beregnes mindst én gang ugentlig. Hvis testkemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst én gang ugentlig.

**Hæmatologisk undersøgelse**

32. Følgende hæmatologiske undersøgelser foretages ved forsøgsperiodens afslutning: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, retikulocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og en måling af koaguleringsevne/tid. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliet eller dets putative metabolitter har eller mistænkes at have oxiderende egenskaber, omfatter methæmoglobinkoncentration og Heinz-legemer.

33. Der tages blodprøver fra et bestemt, angivet sted, lige inden eller i forbindelse med aflivning af dyrene; prøverne opbevares under passende betingelser. Dyrene skal være fastende inden aflivning ([1]).

**Klinisk biokemi**

34. Klinisk-biokemiske bestemmelser med henblik på undersøgelse af vigtige toksiske virkninger i væv, og navnlig i nyrer og lever, foretages med blodprøver, der udtages fra alle dyr lige inden eller i forbindelse med dyrenes aflivning (bortset fra dem, der er fundet døende, og/eller som er aflivet under forsøget). Undersøgelser af plasma eller serum skal omfatte natrium, kalium, glukose, total kolesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, alkalisk fosfatase, γ-glutamyltranspeptidase og glutamat-dehydrogenase), og galdesyrer. Målinger af yderligere enzymer (fra lever eller andre organer) og bilirubin kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger.

35. Følgende urinanalyser kan eventuelt udføres i forsøgets sidste uge til bestemmelse af: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Hvis der benyttes faste, bør analyserne udføres efter de funktionelle observationer i forsøgets fjerde uge.

▼M4

36. Yderligere bør man overveje at måle plasma- eller serummarkører for generel vævsskade. Andre bestemmelser, der bør foretages, hvis testkemikaliets kendte egenskaber kan eller forventes at kunne indvirke på tilsvarende metaboliske funktioner, omfatter kalcium, fosfat, triglycerider, visse hormoner og cholinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

37. Selv om der i den internationale evaluering af de endokrinrelaterede effektparametre ikke blev påvist en klar fordel med henblik på bestemmelse af thyreoideahormoner (T3 og T4) og TSH, kan det være nyttigt at opbevare plasma- eller serumprøver for at måle T3, T4 og TSH (frivillig), hvis der er tegn på en virkning på hypofyse-thyroidea-aksen. Disse prøver kan opbevares nedfrosne ved – 20 °C. Følgende faktorer kan påvirke variabiliteten og de absolutte koncentrationer af hormonanalyserne:

— aflivningstidspunkt på grund af variation i hormonkoncentrationer i løbet af døgnet

— aflivningsmetode, der har til formål at undgå unødig stress af dyrene, som kan påvirke hormonkoncentrationerne

— analysesæt til hormonanalyser, der kan have forskellige standardkurver.

Definitiv identifikation af thyroidea-aktive kemikalier baseret på histopatologisk analyse er mere pålidelig end analyse baseret på hormonniveauer.

38. Plasmaprøver, der specifikt er beregnet til hormonanalyse, tages på et tilsvarende tidspunkt på dagen. Det anbefales, at T3-, T4- og TSH-analyser overvejes i tilfælde af ændringer af histologi for thyroidea. De numeriske værdier, der fås ved analyse af hormonkoncentrationer, varierer ved anvendelse af forskellige analysesæt på markedet. Det betyder, at der muligvis ikke kan opstilles effektivitetskriterier baseret på ensartede historiske data. Alternativet bør laboratorierne tilstræbe at holde variationskoefficienterne til kontrol under 25 for T3 og T4 og under 35 for TSH. Alle koncentrationer registreres i ng/ml.

39. Hvis der ikke foreligger passende data fra tidligere forsøg, bør det overvejes at bestemme hæmatologiske og klinisk-biokemiske variable, inden eksponering påbegyndes, eller så vidt muligt hos en gruppe dyr, der ikke er med i forsøgsgrupperne.

PATOLOGI

**Makroskopisk obduktion**

40. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testikler, bitestikler, prostata og vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands) (som én samlet enhed), thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Forsigtighed skal udvises ved trimming af prostata for at undgå punktering af de væskefyldte vesiculae seminales. Alternativt kan vesiculae seminales og prostata trimmes og vejes efter fiksering.

▼M4

41. To andre væv kan også vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring: ovarier (vådvægt) og uterus med cervix (vejledning om udtagning og forberedelse af uterusvæv med henblik på vejning findes i OECD TG 440 (18)).

42. Skjoldbruskkirtlens vægt (frivillig) bestemmes efter fiksering. Trimming bør også foretages omhyggeligt og først efter fiksering for at undgå beskadigelse af vævet. Beskadiget væv kan kompromittere den histopatologiske analyse.

43. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 47): alle makroskopiske læsioner, hjerne (repræsentative regioner, herunder cerebrum, cerebellum og pons), rygmarv, øjne, mavesæk, tyktarm og tyndtarm (herunder Peyerpletter), lever, nyrer, binyrer, milt, hjerte, thymus, skjoldbruskkirtel, spiserør og lunger (præserveret ved oppumpning med fikseringsmiddel og efterfølgende immersion), gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, prostata og vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands), vagina, urinblære, lymfeknuder [ud over den nærmeste drænende lymfeknude bør en anden lymfeknude udtages på baggrund af laboratoriets erfaring (15)], perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen, skeletmuskel og knogle med knoglemarv (afsnit eller som alternativt et nyligt præpareret knoglemarvsaspirat). Det anbefales, at testikler fikseres ved immersion i Bouins eller modificeret Davidsons fikseringsmiddel (16) (17). Tunica albuginea punkteres forsigtigt og overfladisk i begge ender af organet med en kanyle, der muliggør hurtig penetration af fikseringsmidlet. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

44. Følgende væv kan give værdifulde indikationer på endokrinrelaterede virkninger: gonader (testikler og æggestokke), sekundære kønsorganer (uterus med cervix, bitestikler, vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands), dorsolateral og ventral prostata), vagina, hypofyse, brystkirtler fra handyr, skjoldbruskkirtel og binyrer. Forandringer i brystkirtler fra handyr er ikke tilstrækkeligt dokumenteret, men denne parameter kan være meget sensitiv over for stoffer med østrogen virkemåde. Observation af organer/væv, der ikke er anført i afsnit 43, er frivillig (se tillæg 2).

45. I vejledningen om histopatologi (19) findes der flere oplysninger om dissekering, fiksering, udtagning af snit og histopatologisk undersøgelse af endokrine væv.

46. I det internationale testprogram blev der fremskaffet dokumentation for, at små hormonforstyrrende virkninger af kemikalier med ringe evne til at påvirke homeostase for kønshormoner kan identificeres ud fra forstyrrelse af synkroniseringen af brunstcyklussen i forskellige væv og ikke i så høj grad ud fra direkte histopatologiske forandringer i hundyrenes kønsorganer. Selv om der ikke blev fremskaffet definitivt bevis for sådanne virkninger, anbefales det, at bevis for mulig asynkronicitet i brunstcyklussen tages i betragtning ved fortolkningen af histopatologiske undersøgelser af æggestokke (follikulære celler og theca-granulosaceller), uterus, cervix og vagina. Cyklusfasen bestemt ved vaginalt smear kan, hvis den vurderes, også medtages i denne sammenligning.

▼M4

**Histopatologi**

47. En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

48. Alle makroskopiske læsioner undersøges.

49. Hvis der anvendes en satellitgruppe, skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

50. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

51. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Sammenligninger af virkningen i et dosisinterval bruges til at undgå brugen af flere t-test. Valg af statistisk metode skal finde sted i forbindelse med fastlæggelsen af forsøgets design.

52. Med henblik på kvalitetskontrol foreslås det, at historiske kontroldata indsamles, og at variationskoefficienter beregnes for numeriske data, især for parametre med relation til bestemmelse af hormonforstyrrende effekter. Disse data kan bruges i forbindelse med sammenligninger, når de faktiske forsøg evalueres.

**Testrapport**

53. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata.

*For eventuelt vehikel:*

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

*For forsøgsdyrene:*

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse

— begrundelse for andre arter end rotte.

*Testbetingelser:*

— begrundelse for valg af dosisniveau

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning, opnået koncentration, præparatets stabilitet og homogenitet

▼**M4**

— oplysninger om administration af testkemikaliet

— eventuel omregning fra testkemikaliekoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg kropsvægt pr. dag)

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

*Valgfrie undersøgte effektparametre*

— liste over valgfrie undersøgte effektparametre.

*Resultater:*

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— vurdering af sanseevne, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— kropsvægt ved aflivning og organvægte

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

*Diskussion af resultaterne*

*Konklusioner*

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Androgenicitet:** et kemikalies evne til at fungere som et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

**Antiandrogenicitet:** et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt androgent hormon (f.eks. testosteron) i en pattedyrsorganisme.

**Antiøstrogenicitet:** et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

**Antithyreoid aktivitet:** et kemikalies evne til at undertrykke virkemåden for et naturligt thyreoideahormon (f.eks. $T_3$) i en pattedyrsorganisme.

**Dosering:** et generelt udtryk, som indbefatter dosis, doseringens hyppighed og anvendelsens varighed.

**Dosis:** den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægt af testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets vægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag) eller som en konstant koncentration i foderet.

**Synlig toksicitet:** et generelt udtryk, som angiver klare tegn på toksicitet efter indgift af testkemikaliet. De bør være tilstrækkelige til risikovurdering og bør være af en sådan karakter, at en forøgelse af den indgivne dosis må forventes at resultere i udviklingen af svære toksiske virkninger og sandsynlig mortalitet.

**NOAEL:** forkortelsen for »no-observed-adverse-effect level« (niveau uden observerbare negative effekter), dvs. det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede negative virkninger.

**Østrogenicitet:** et kemikalies evne til at fungere som et naturligt østrogent hormon (f.eks. østradiol 17ß) i en pattedyrsorganisme.

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

**Thyreoid aktivitet:** et kemikalies evne til at fungere som et naturligt thyreoideahormon (f.eks. $T_3$) i en pattedyrsorganisme.

**Validering:** en videnskabelig proces, der har til formål at karakterisere de operationelle krav og begrænsninger vedrørende en testmetode og påvise dens pålidelighed og relevans i forbindelse med et bestemt formål.

▼M4

*Tillæg 2*

**Anbefalede effektparametre til påvisning af hormonforstyrrende stoffer i testmetode B.7**

| Obligatoriske effektparametre | Valgfrie effektparametre |
|---|---|
| Vægt | |
| — Testikler<br>— Bitestikler<br>— Binyrer<br>— Prostata og vesiculae seminales med prostata anterior | — Æggestokke<br>— Uterus med cervix<br>— Skjoldbruskkirtlen |
| Histopatologi | |
| — Gonader:<br>— Testikler<br>— Æggestokke<br>— Sekundære kønsorganer:<br>— Bitestikler<br>— Prostata og vesiculae seminales med prostata anterior<br>— Uterus med cervix<br>— Binyrer<br>— Skjoldbruskkirtlen<br>— Vagina | — Vaginalt smear<br>— Brystkirtler fra handyr<br>— Hypofyse |
| Hormonmåling | |
| | — Cirkulationsniveau for T3 og T4<br>— Cirkulationsniveau for TSH |

*LITTERATUR:*

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼**M4**

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.htm l

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. I: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE og Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals No.440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. **SUBAKUT TOKSICITET (INHALATION): 28-DAGES FORSØG**

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.8 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliets toksicitet ved inhalation efter gentagen eksponering i en begrænset periode (28 dage) og at fremskaffe data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af mindst fem hangnavere og fem hungnavere eksponeres i seks timer om dagen i 28 dage for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehikelkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 412 (2009). Den oprindelige Test Guideline 412 (TG 412) for subakut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.8 (som svarer til den reviderede TG 412) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.

2. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 28 dage. Data, der udledes af 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger [hvis de ikke efterfølges af et 90-dages forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation (kapitel B.29 i dette bilag)]. Dataene kan også give informationer om, hvilke koncentrationer der skal vælges til forsøg med længere varighed, f.eks. 90-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af forsøg med akut toksicitet ved inhalation. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.

▼M4

4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad [se GD 39 (2)]. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.

5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet i forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

**Forberedelse af dyrene**

7. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

**Dyreopdræt og -sundhed**

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

▼M4

**Inhalationskamre**

9. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG

**Grænsekoncentrationer**

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekoncentrationer i 28-dages forsøg med subakut toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskoncentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskoncentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Der gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekoncentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

**Dosisbestemmende forsøg**

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, kan det være nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-koncentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødig belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.

12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Højst tre hanner og tre hunner bør eksponeres ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 14 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-koncentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

▼M4

13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfaters hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner ($T_3$, $T_4$) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

**Hovedforsøg**

14. Hovedforsøget vedrørende subakut toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 17). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringsniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processer). Hver testgruppe består af mindst 10 gnavere (5 hanner og 5 hunner), der eksponeres for testkemikaliet i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på fire uger (samlet forsøgsvarighed på 28 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

15. De valgte målkoncentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:

— Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.

— De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graduerede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.

— Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ringe eller ingen toksisk virkning.

**Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)**

16. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af fem hanner og fem hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikaliet ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikelkontrolgrupper (se afsnit 17).

▼M4

**Kontroldyr**

17. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikaliet. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontroldyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER

**Administration af koncentrationer**

18. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

**Partikelstørrelsesfordeling**

19. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 μm med en geometrisk standardafvigelse ($\sigma_g$) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

**Fremstilling af testkemikalie i vehikel**

20. Ideelt testes testkemikaliet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikaliet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

**Luftgennemstrømning i kammer**

21. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås.

▼M4

Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

**Kammerets temperatur og relative fugtighed**

22. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

**Testkemikalie: nominel koncentration**

23. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

**Testkemikalie: faktisk koncentration**

24. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet målt ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.

25. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

▼M4

26. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer ($t_{95}$) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret ($t_{95}$) og henfald. Vejledning i beregning af $t_{95}$ findes i GD 39 (2).

27. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

**Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling**

28. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.

29. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.

30. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

31. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslanger på dyrene, dårligt belyste helkropskamre eller uigennemsigtige atmosfærer, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.

▼**M4**

32. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

33. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, biooverv̊agning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdsændringer.

KROPSVÆGT

34. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første to uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionsperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

35. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

KLINISK PATOLOGI

36. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).

37. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactat-dehydrogenase, sorbitol-dehydrogenase, glutamat-dehydrogenase og γ-glutamyltranspeptidase).

▼M4

*Tabel 1*

**Standardparametre for klinisk patologi**

| Hæmatologisk undersøgelse | |
|---|---|
| Erythrocyttælling | Leukocyttal |
| Hæmatokrit | Differentialtælling |
| Hæmoglobinkoncentration | Trombocyttal |
| Middelcellehæmoglobin | Koaguleringsevne (vælg én): |
| Middelcellevolumen | — protrombintid |
| Middelcellehæmoglobinkoncentration | — koaguleringstid |
| Retikulocyttælling | — partiel tromboplastintid |

| Klinisk-kemisk undersøgelse | |
|---|---|
| Glukose (*) | Alanin-aminotransferase |
| Total kolesterol | Aspartat-aminotransferase |
| Triglycerider | Alkalisk fosfatase |
| BUN | Kalium |
| Total bilirubin | Natrium |
| Kreatinin | Kalcium |
| Protein | Fosfor |
| Albumin | Chlorid |
| Globulin | |

| Urinanalyse (valgfri) | |
|---|---|
| Udseende (farve og turbiditet) | Total protein |
| Volumen | Glukose |
| Specifik vægtfylde eller osmolalitet | Blod/blodceller |
| pH | |

(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den være tilpasset den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde sammen med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).

38. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocyttal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indicerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylning findes i GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

39. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

40. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

*Tabel 2*

**Organer og væv, der præserveres under makroskopisk obduktion**

| | |
|---|---|
| **Binyrer** | Vesiculae seminales |
| Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat) | Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal) |
| **Hjerne** (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | **Milt** |
| [Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg] | Mavesæk |
| **Hjerte** | **Testikler** |
| **Nyrer** | **Brisler** |
| Larynx (3 niveauer, 1 niveau, som omfatter basis af strubelåget) | Skjoldbruskkirtlen |
| **Lever** | Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit) |
| **Lunge** (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier) | [Urinblære] |
| Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtopløselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder. | Uterus |
| Nasopharyngeale væv (mindst niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) | Alle større læsioner |
| Øsofagus | |
| [Bulbus olfactorius] | |
| Æggestokke | |

▼M4

41. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskylning, udtages en ikkeskyllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).

42. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5, 6, 7, 8, 9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT; 10, 11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

43. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste koncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, hvor der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højeksponeringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

44. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og uventede resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

**Testrapport**

45. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

*Forsøgsdyr og pasning*

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

▼M4

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

*Testkemikalie*

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

*Vehikel*

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

*Inhalationskammer*

— detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— behandling af tilført/udledt luft

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret ($t_{95}$)

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

*Eksponeringsdata:*

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

▼M4

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, $mg/m^3$ osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

*Testbetingelser*

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

*Resultater*

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og $\sigma_g$

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

▼M4

— opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt

— opstilling i tabelform af foderindtagelse

— opstilling i tabelform af kliniske patologiske data

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— opstilling i tabelform af eventuelle andre målte parametre.

*Diskussion og fortolkning af resultater*

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

— Målorganet (-organerne) identificeres.

— NOAEL og LOAEL bestemmes.

*LITTERATUR:*

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No. 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP og Ward JM (eds) Carcinogenesis. TARGET Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.9. **TOKSICITET VED GENTAGEN DOSERING (28 DAGE, DERMAL)**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B (punkt A).

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B (punkt B).

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres dagligt huden i graduerede doser på grupper af forsøgsdyr, idet der anvendes en bestemt dosis til hver gruppe gennem en periode på 28 dage. I eksponeringspenoden observeres dyrene dagligt for symptomer på toksisk virkning. Dyr, der dør under forsøget, obduceres, og ved forsøgets afslutning aflives og obduceres de overlevende dyr.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Unge sunde dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper, inden forsøget sættes i gang. Kort før forsøget indledes, klippes dyrene på ryggen. Såfremt dyrene barberes, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning og barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af kroppens overflade klargøres til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som i givet fald kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel, så der sikres god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Teststoffet påføres dagligt 5-7 dage om ugen.

1.6.2. **Forsøgsbetingelser**

1.6.2.1. *Forsøgsdyr*

Der kan anvendes voksne rotter, kaniner eller marsvin. Der kan også anvendes andre dyrearter, men i så fald skal det begrundes.

▼B

Ved forsøgets begyndelse må vægten af de anvendte dyr ikke variere mere end ± 20 % fra en rimelig gennemsnitsvægt.

1.6.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes mindst ti dyr (fem hunner og fem hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på ti dyr (fem af hvert køn) for den højeste dosis i 28 dage og gennem en periode på 14 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller forsinkede toksiske virkninger. Der anvendes tillige en satellitgruppe på ti kontroldyr (fem af hvert køn).

1.6.2.3. *Dosisniveauer*

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er på mindst seks timer dagligt. Teststoffet påføres på omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (én gang eller to gange om ugen), så de er konstante i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra påføring af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis påføring af teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, sænkes koncentrationen, hvilket kan medføre, at andre toksiske virkninger på det højeste dosisniveau svækkes eller forsvinder. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afslutte forsøget og foretage et nyt forsøg med lavere koncentrationer.

1.6.2.4. *Grænsetest*

Hvis der i en indledende undersøgelse med en dosis på 1 000 mg/kg legemsvægt eller en større dosis fastsat ud fra kendskab til den eksponering, mennesker kan blive udsat for, ikke konstateres nogen toksisk virkning, kan yderligere test betragtes som unødvendige.

1.6.2.5. *Observationsperiode*

Dyrene observeres dagligt for symptomer på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkter for toksicitetssymptomers fremkomst og forsvinden registreres.

▼B

1.6.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene holdes i hvert sit bur. Den ideelle dosering består i påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage. En eventuel satellitgruppe beregnet til opfølgningsobservationer holdes i yderligere 14 dage uden påføring af teststof, således at det kan registreres, om toksiske virkninger er reversible, eller om de vedvarer. Den daglige eksponeringsperiode er på mindst seks timer.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede legemsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet skal påføres så tyndt og ensartet over en så stor del af området som muligt.

Teststoffet skal holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden tildækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så at dyrene ikke kan indtage teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet; dog kan fuldstændig immobilisering ikke anbefales. Alternativt kan der benyttes en beskyttelseskrave.

Ved eksponeringsperiodens afslutning fjernes tilbagesiddende teststof, idet der f.eks. anvendes vand eller et andet egnet middel til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og toksicitetssymptomer registreres, herunder hvornår disse symptomer optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønsteret. Dyrene vejes én gang om ugen. Det anbefales, at der også holdes regnskab med den ugentlige fødeindtagelse. Dyrene observeres med jævne mellemrum, så dyr ikke går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets slutning aflives og obduceres alle overlevende dyr med undtagelse af dem i satellitgrupperne. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

Ved forsøgets afslutning skal alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes følgende undersøgelser:

1) hæmatologisk analyse omfattende mindst hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling og et mål for koaguleringsevnen

2) klinisk biokemisk blodanalyse omfattende mindst en lever- og nyrefunktionsparameter: serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Andre bestemmelser, der kan være påkrævet for en fyldestgørende toksikologisk vurdering, er calcium, phosphor, chlorid, natrium, kalium, glucose efter faste, lipidanalyser, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin og cholinesteraseaktivitet.

▼B

Der kan udføres yderligere klinisk-biokemiske analyser, hvor det skønnes nødvendigt for videre undersøgelse af observerede virkninger.

1.6.4. **Makroskopisk undersøgelse**

Alle forsøgsdyrene underkastes en fuldstændig makroskopisk undersøgelse. Lever, nyrer, binyrer og testes vejes så hurtigt som muligt efter udtagningen, så udtørring undgås. Væv og organer, dvs. normal og eksponeret hud, lever, nyrer, milt, testes, binyrer, hjerte og målorganer (dvs. organer, der udviser makroskopiske læsioner eller forandringer i størrelse), opbevares i et passende medium med henblik på eventuel senere histopatologisk undersøgelse.

1.6.5. **Histopatologisk undersøgelse**

Der foretages en histologisk undersøgelse af præpareret væv og organer fra dyrene i kontrolgruppen samt i den gruppe, der har været udsat for den største dosis. Observeres der i gruppen med den højeste dosis vævs- eller organdefekter, som kan tilskrives teststoffet, undersøges de samme væv og organer i grupperne med lavere dosis. Dyrene i satellitgruppen underkastes en histologisk undersøgelse, især de væv og organer, der udviser virkning i de øvrige grupper.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antallet af dyr ved begyndelsen af forsøget, og for hver type læsion det antal dyr, der udviser den pågældende læsion.

Evaluering af samtlige observationer skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— dyreart/stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser (herunder forbindingstypen: med eller uden okklusion)

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— nuleffektniveau, hvor det er muligt

— oplysninger om toksiske reaktioner opdelt efter køn og dosis

— angivelse af dyrenes dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets slutning

— toksiske og andre virkninger

— for hvert enkelt abnormitetstegn det tidspunkt, hvor det er observeret, og dets senere udvikling

— foder- og legemsvægt

— hæmatologiske analyser og samtlige resultater

▼B

— klinisk-biokemiske analyser og samtlige resultater

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B (punkt D).

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B (punkt E).

▼B

B.10. **MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I CELLER FRA PATTEDYR**

1. **METODE**

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 473 In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INDLEDNING

Formålet med in vitro-testen for kromosomaberrationer er at påvise, om et stof eller andet forårsager strukturelle kromosomafvigelser i dyrkede pattedyrceller (1) (2) (3). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. Den foreliggende metode er imidlertid ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til dette formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgsdyr.

I in vitro-testen for kromosomaberrationer kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer, cellestammer eller primære cellekulturer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning, karotypens stabilitet, kromosomtal, kromosomdiversitet og hyppighed af spontane kromosomaberrationer.

Ved udførelse af in vitro-test er det i reglen nødvendigt at benytte en exogen kilde til metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændig efterligne betingelserne i et levende pattedyr. Man må omhyggeligt undgå betingelser, som fører til et positivt resultat, der ikke skyldes selve mutageniciteten, men kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (4) (5).

Testen benyttes til at screene for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der giver positivt resultat med denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, men der er ikke fuldstændig korrelation mellem testen og carcinogenicitet. Korrelationen afhænger af den kemiske sammensætning, og der er stadig tydeligere tegn på, at nogle carcinogener ikke påvises ved denne test, fordi de lader til at virke ved andre mekanismer end direkte beskadigelse af dna.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

**Aberration af kromatidtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

**Aberration af kromosomtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

▼B

**Endofordobling:** en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i dna-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

**Gap:** en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor forskydning af kromatiderne er minimal.

**Mitoseindeks:** forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; det viser populationens formeringsgrad.

**Antalsafvigelse:** ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

**Polyploidi:** et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n osv.).

**Strukturel ændring:** ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Cellekulturer udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Efter forud fastsatte tidsrum efter at være udsat for teststoffet behandles kulturerne med et metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin), hvorefter de høstes og farves; dernæst undersøges metafasecellerne mikroskopisk for forekomst af kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Celler*

Der kan benyttes en række forskellige cellelinjer, -stammer og primære cellekulturer, herunder humane celler (f.eks. fibroblaster fra kinesisk hamster eller perifere blodlymfocytter fra det perifere blod hos mennesker eller andre pattedyr).

1.4.1.2. *Substrater og dyrkningsforhold*

Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningssubstrater og inkuberingsbetingelser (dyrkningsflaskcr, $CO_2$-koncentration, temperatur og luftfugtighed). Etablerede cellelinjer og -stammer kontrolleres regelmæssigt for stabilt karakteristisk kromosomtal og mycoplasmakontaminering; i tilfælde af kontaminering anvendes kulturen ikke. Cellernes normale cyklustid og dyrkningsbetingelserne skal være kendt.

1.4.1.3. *Fremstilling af kulturer*

Etablerede cellelinjer og -stammer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningssubstrat med en sådan tæthed, at kulturerne ikke flyder sammen inden høst, og inkuberes ved 37 °C.

▼B

Lymfocytter: fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks, heparin), eller lymfocytter fra sunde individer tilsættes til dyrkningssubstratet, der indeholder et mitogen (f.eks. phytohæmagglutinin), og inkuberes ved 37 ºC.

1.4.1.4. *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (6) (7) (8) (9), eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (10) (11) (12).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Et metabolismeaktiveringssystems beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes med tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2. *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. konfluens, antal levedygtige celler eller mitoseindeks. Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

▼B

Der benyttes mindst tre analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og √10. På højsttidspunktet skal konfluens, celleantal eller mitoseindeks være faldet signifikant ved den højeste koncentration (mere end 50 %). Mitoseindekset er kun et direkte mål for cytotoksisk/cytostatisk virkning og afhænger af, hvor lang tid der er forløbet efter behandlingen. Mitoseindeks er dog acceptabel for dyrkning i rystekolber, hvor andre toksicitetsmål er besværlige eller ubrugelige i praksis. Oplysninger om cellecyklens kinetik, såsom den gennemsnitlige generationstid (AGT), kan benyttes som supplerende information. AGT er imidlertid et overordnet gennemsnit, der ikke altid afslører forsinkede subpopulationer, og selv en lille forøgelse af den gennemsnitlige generationstid kan føre til en meget betydelig forsinkelse af tidspunktet for optimalt udbytte af aberrationer.

For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 µl/ml, 5 mg/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

For forholdsvis uopløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer under opløselighedsgrænsen, skal der som højeste dosis benyttes en koncentration, der er højere end opløselighedsgrænsen i det samlede dyrkningssubstrat ved behandlingens afslutning. I nogle tilfælde (f.eks. når toksicitet kun optræder over den laveste koncentration med uopløselighed) tilrådes det at gennemføre testen ved mere end én koncentration med synlig udfældning. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler S9. serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

1 positive kontrolprøver benyttes der et kendt clastogen i en mængde, der forventes at give reproducerbar og påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne, hvorved testsystemets følsomhed godtgøres.

Der vælges sådanne koncentrationer i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

| Metabolismeaktivering | Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|---|
| Ingen exogen metabolismeaktivering | Methylmethansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |

▼B

| Metabolismeaktivering | Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|---|
| | Ethylnitrosourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| | Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| | 4-Nitroquinoline-N-oxid | 56-57-5 | 200-281-1 |
| Exogen metabolismeaktivering | Benzo[a]pyrene | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal i hver høst indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

1.4.3.1. *Behandling med teststof*

Celler under formering behandles med teststoffet med og uden tilstedeværelse af et metabolismeaktiveringssystem. Behandling af lymfocytter påbegyndes ca. 2 døgn efter stimulering med mitogen.

1.4.3.2. Der benyttes normalt dobbeltbestemmelse ved hver koncentration, hvilket også stærkt tilrådes for negative kontrolprøver (kontrolprover med opløsningsmiddel). Hvis det på grundlag af tidligere forsøg kan godtgøres, at forskellen mellem dobbeltbestemmelser (13) (14) er minimal, kan enkeltbestemmelse ved hver koncentration accepteres.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (15) (16).

1.4.3.3. *Høst af kulturer*

I det første forsøg udsættes cellerne for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i 3-6 timer, og der udtages prøve efter et tidsrum, der svarer til ca.1,5 gange cellecykluslængden, regnet fra behandlingens begyndelse (12). Fører denne protokol til negativt resultat både med og uden aktivering, udføres endnu et forsøg, denne gang med kontinuerlig behandling indtil prøveudtagning efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5 gange en normal cellecyklus. Nogle kemiske stoffer er det lettere at bestemme ved behandlings/prøveudtagningstider på mere end 1,5 gange cellecyklussen. Negativt resultat med metabolismeaktivering skal bekræftes i hvert enkelt tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes.

▼B

1.4.3.4. *Kromosompræparering*

Cellekulturerne behandles med Colcemid® eller colchicin normalt 1-3 timer før høst. Høst og kromosompræparering skal foregå særskilt for hver enkelt kultur. Kromosompræpareringen består i hypotonisk behandling af cellerne, fiksering og farvning.

1.4.3.5. *Analyse*

Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet ± 2 for alle celletyper. Der skal bedømmes mindst 200 vel fordelte metafaser pr. koncentration og kontrolgruppe, ligeligt fordelt mellem eventuelle dobbeltprøver. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages høje aberrationstal.

Selv om testens formål er at påvise ændringer i kromosomstrukturen, er det vigtigt også at notere polyploidi og endofordobling, hvis dette konstateres.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Da cellen er forsøgets måleenhed, bedømmes det, hvilken procentdel af cellerne der har ændret kromosomstruktur. Forskellige strukturændringer noteres med antal og hyppighed for både forsøgs- og kontrolkulturer. Gaps noteres særskilt og registreres, men medregnes normalt ikke i den samlede aberrationshyppighed.

Sideløbende målinger af cytotoksicitet for alle behandlede og negative kontrolkulturer i hovedforsøget registreres ligeledes.

Dataene præsenteres for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Der er redegjort for behovet for bekræftelse af negative resultater i punkt 1.4.3.3. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for opnåelse af et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse eller en reproducerbar forøgelse af antallet af celler med kromosomaberrationer. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (3) (13). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

▼B

En forøgelse i antallet af polyploide celler kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at inhibere mitoseprocesser og fremkaldte kromosomantalsafvigelser. En forøgelse af antallet af celler med endofordoblede kromosomer kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (17) (18).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder ændringer i kromosomstrukturen i dyrkede somatiske celler fra pattedyr.

3. **RAPPORTERING**

*TESTRAPPORT*

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Celler:

— celletype og -kilde

— den valgte celletypes karyotypiske karakteristika og egnethed

— eventuelt fravær af mycoplasma

— oplysninger om cellecyklussens længde

— bloddonorers køn. fuldblod eller fraseparerede lymfocytter samt benyttet mitogen

— eventuelt antal passager

— eventuelle metoder til vedligehold af cellekulturer

— normalt kromsomtal

Testbetingelser:

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og længden af cellernes udsættelse for stoffet

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel $CO_2$-koncentration

▼B

— teststoffets koncentration

— volumen af tilsat bærestof og teststof

— inkuberingstemperatur

— inkuberingstid

— behandlingens varighed

— celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— positive og negative kontrolprøver

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede metafaser

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet, f.eks. konfluens, cellecyklusdata, celletælling og mitoseindeks

— tegn på udfældning

— data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt

— definitioner af aberrationer, herunder gaps

— antal celler med kromosomaberrationer og typen af disse, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur

— eventuel iagttaget ændring i ploidigrad

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender. A, (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427-432.

▼B

(3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S, Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, M.A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutaden 10 (suppl. 10), pp. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPLMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation Res., 268. pp. 297-305.

(6) Arnes, B.N., McCann, J,. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(7) Maron, D.M. and Arnes, B.N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(8) Natarajan. A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/ Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro,* J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, Mutation Res., 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro,* Mutation Res., 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B.M., Combes. R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D,G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclar 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Berid, J.R. and Philpot, R.M. (eds), In Vitro Metabolic Activalion in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M. Jr., Iven, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Res., 312, pp. 241-261.

(13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *in Vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation of Mulagenicity Test Data, Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res., 312, pp. 139-149.

(15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.I., Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.

▼B

(16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, Mulation Res., 119, pp. 403-413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, pp. 1362-1364.

▼B

B.11. **MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I KNOGLEMARV HOS PATTEDYR**

1. **METODE**

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 475 Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for kromosomaberrationer hos pattedyr benyttes til at påvise, om et teststof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i knoglemarvceller hos dyr, normalt gnavere (1) (2) (3) (4). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. Ploiditetsforøgelse kan være tegn på, at et kemisk stof er i stand til at fremkalde antalsafvigelser. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromosomtypen, men også ændringer af kromatidtypen forekommer. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og meget tyder på, at kromosommutationer og lignende, som ændrer på onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler, medvirker ved induktion af kræft hos mennesker og i forsøgssystemet.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Knoglemarv er målvævet i denne test, da det er et væv med høj vaskularisation og består af celler med kort cyklustid, som er lette at isolere og behandle. Metoden omfatter ikke andre arter og væv.

Denne test for kromosomaberrationer er særlig relevant for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, da den giver mulighed for at tage sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser i betragtning, selv om de kan variere fra art til art og fra væv til væv. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

**Aberration af kromatidtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

**Aberration af kromsomtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

**Endofordobling:** en proces, hvorved cellekernen efter en S-fase i DNA-replikationen ikke fortsætter over i mitosen, men påbegynder endnu en S-fase. Resultatet er kromosomer med 4, 8, 16, ... kromatider.

**Gap:** en akromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

**Antalsafvigelse:** ændring af kromosomtallet i forhold til det for de pågældende celler normale antal.

▼B

**Polyploidi:** et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n osv.).

**Strukturel ændring:** ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner og fragmenter, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af knoglemarvceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, mus og kinesiske hamstere, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ±20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fordring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til del B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage.

1.4.1.4. *Fremstilling uf doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

| Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|
| Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| Ethylnitrosourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontrolgrupper, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof, og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr og hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel/bærestof ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn. Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives fortrinsvis i en enkelt dosis. De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

▼B

Der udtages prøver på to tidspunkter efter endagsbehandling. For gnavere udtages første prøve normalt 1,5 normal cellecykluslængde (som normalt er 12-18 timer) efter behandlingen. Da det optimale tidspunkt for påvisning af kromosomaberrationer kan afhænge af, hvor lang tid der er påkrævet for optagelse og metabolisme af teststoffet, og af teststoffets indvirkning på cellecyklussens kinetik, anbefales det at udtage endnu en prøve 24 timer efter den første. Indgives stoffet over mere end én dag, udtages der blot én prøve, når der er gået 1,5 normal cellecykluslængde efter den sidste behandling.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøve af forsøgsdyrene efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for kinesisk hamster ca. fire-fem timer. Cellerne høstes fra knoglemarven og analyseres for kromosomaberrationer.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (5). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet, Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. mitoseindeks nedsat med mere end 50 %).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. For længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg/kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg/kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokal-irriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

▼B

1.5.6. **Præparering af kromosomer**

Umiddelbart efter aflivningen udtages knoglemarven, som udsættes for hypotonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. **Analyse**

Mitoseindekset bestemmes som udtryk for cytotoksiciteten i mindst 1 000 celler pr. dyr for alle behandlede dyr (inkl. positive kontroldyr) og ubehandlede (negative) kontroldyr.

For hvert dyr bør mindst 100 celler analyseres. Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da præpareringen af objektglas ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ± 2.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte celler, antallet af aberrationer pr. celle og den procentdel af cellerne, der har kromosomaberrationer. Forskellige typer strukturelle kromosomændringer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (6). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

En forøgelse af ploiditetsgraden kan være tegn på, at teststoffet er i stand til at fremkalde kromosomantalsafvigelser. En forøget endofordobling kan være tegn på, at teststoffet kan inhibere cellecyklussens forløb (7) (8).

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

▼B

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer viser, at teststoffet fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art. At negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder kromosomaberrationer i knoglemarven hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr samt deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

▼B

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— mitoseindex

— antal aberrationer og type. anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— antal celler med aberrationer pr. gruppe med gennemsnit og standardafvigelse

— eventuel iagttaget ændring i ploiditetsgrad

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative kontrolprøver

— data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for sideløbende positive kontrolprøver

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Adler, L.D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford. Washington D.C., pp. 27 5-306.

(2) Preston. R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H. McFee, A.F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation Res., 189, pp. 157-165.

(3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland, (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(4) Tice, R.R. Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Paccierotti, F., Preston, R.J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation Res., 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R.J., Alleen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in in Vivo Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 313-319.

▼B

(6) Lovell, D.P., Andersen, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, Mutation Res. 119, pp. 403-413.

(8) Huang. Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, pp. 1363-1 364.

▼B

## B.12. MUTAGENICITET — IN VIVO-TEST FOR MIKROKERNER I ERYTHROCYTTER HOS PATTEDYR

### 1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

### 1.1. INDLEDNING

In vivo-testen for mikrokerner hos pattedyr benyttes til påvisning af skader, som teststoffet har forvoldt på kromosomer eller mitoseapparatet i erythroblaster, ved analyse af erythrocytter i prøver fra knoglemarv og/eller det perifere blod hos dyr, sædvanligvis gnavere.

Formålet med mikrokernetesten er at påvise stoffer, der forvolder cytogenetiske skader, som medfører dannelse af mikrokerner indeholdende tiloversblevne kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

Når en erythroblast i knoglemarven udvikler sig til en polykromatisk erythrocyt, udstødes cellekernen, og en eventuel dannet mikrokerne kan blive tilbage i det ellers kernefri cytoplasma. I disse celler er mikrokerner let synlige, da de ellers ikke har nogen kerne. Forøget forekomst af polykromatiske erythrocytter med mikrokerne hos behandlede dyr er tegn på inducerede kromosomskader.

I denne test benyttes der rutinemæssigt knoglemarv hos gnavere, da der i dette væv produceres polykromatiske erythrocytter. Måling af umodne (polykromatiske) erythrocytter med mikrokeme i det perifere blod kan også accepteres i andre arter, hvor det er vist, at milten ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerner, eller at deres følsomhed over for stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer, er tilstrækkelig. Mikrokerner kan genkendes på en række kriterier, bl.a. om der er en DNA-centromer til stede. Det vigtigste endpoint er hyppigheden af umodne (polykromatiske) erythrocyter med mikrokerne. Det antal modne (normokromatiske) erythrocytter i det perifere blod, som indeholder mikrokerner, ud af et givet antal modne erythrocytter kan også benyttes som endpoint for testen, når dyrene behandles kontinuerligt i mindst fire uger.

Denne in vivo-test for mikrokerner hos pattedyr er særlig relevant for vurdering af den reelle mutagenitetsfare, idet den tager højde for sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og DNA-reparationsprocesser, selv om disse kan variere fra art til art, væv til væv og genetisk endpoint til genetisk endpoint. En in vivo-test er ligeledes nyttig til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist ved en in vitro-test.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til del B.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Centromer:** region(er) af et kromosom, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

**Mikrokerner:** små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens telofase (meiose) ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

**Normochromatisk erythrocyt:** moden erythrocyt. der mangler ribosomer og kan skelnes fra umodne polykromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

**Polychromatisk erythocyt:** umoden erythrocyt på et udviklingsmellemstadium, som stadig indeholder ribosomer og derfor kan skelnes fra modne normokromatiske erythrocytter ved ribosomselektiv farvning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde. Hvis der benyttes knoglemarv, aflives dyrene på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter knoglemarven udtages, og der fremstilles præparater og farves (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Hvis der benyttes perifert blod, tages der blodprøver på et passende tidspunkt efter behandlingen, hvorefter der fremstilles udstrygningspræparater og farves (4) (8) (9) (10). I undersøgelser med perifert blod bør der gå så kort tid som muligt mellem sidste eksponering og cellehøst. Præparaterne analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner.

1.4. BESKRIVELSE AE TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der anbefales mus eller rotter, hvis der bruges knoglemarv, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Bruges der perifert blod, anbefales mus. Dog kan enhver egnet pattedyrart benyttes, hvis dens milt ikke kan fjerne erythrocytter med mikrokerne, eller hvis den er vist at være tilstrækkelig følsom til at påvise stoffer, der forårsager strukturelle eller antalsmæssige kromosomaberrationer. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til del B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

▼B

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt unge sunde voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes til laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning.

1.4.1.4. *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper af begge køn. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe mikrokerner in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

| Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|
| Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| N-ethyl-N-nitrosourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

▼B

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med mikrokerner. Hvis der kun udtages én negativ kontrolprøve, er det mest hensigtsmæssigt at gøre det ved første prøveudtagning. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

Hvis der benyttes perifert blod, kan en forbehandlingsprøve også accepteres som sideløbende negativ kontrolprøve, men kun i de korte undersøgelser (f.eks. 1-3 behandlinger), når de opnåede resultater ligger inden for det forventede interval for den forudgående kontrolprøve.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare dyr af hvert køn (11). Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun ét køn tilstrækkelig. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Der kan ikke anbefales nogen standardbehandlingsplan (dvs. 1, 2 eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum). Prøver fra længdervarende indgiftsplaner er acceptable, når blot der i undersøgelsen er påvist en positiv virkning eller — for en negativ undersøgelse — der er påvist toksicitet, eller grænsedosis har været anvendt, og når indgiften er fortsat indtil prøveudtagningen. Prøvestoffet kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen.

Testen kan udføres på følgende to måder:

a) Dyrene behandles med teststoffet én gang, Der udtages prøver af knoglemarv mindst to gange, første gang tidligst 24 timer efter behandlingen, med passende intervaller mellem prøverne, sidste prøve dog senest 48 timer efter behandlingen. Prøveudtagning tidligere end 24 timer efter behandlingen skal begrundes. Der udtages prøver af perifert blod mindst to gange, tidligst 36 timer efter behandlingen og med passende intervaller efter den første prøve, sidste prøve dog senest efter 72 timer. Når der i en prøve er konstateret positiv reaktion, er yderligere prøveudtagning ikke nødvendig.

▼B

b) Benyttes der to eller flere daglige behandlinger (f.eks. to eller flere behandlinger med 24 timers mellemrum) udtages der for knoglemarvs vedkommende prøver én gang mellem 18 og 24 timer efter den sidste behandling, og for perifert blods vedkommende én gang mellem 36 og 48 timer efter den sidste behandling (12).

Derudover kan der udtages prøver på andre tidspunkter, hvis det er relevant.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (13). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i knoglemarven (f.eks. en nedsættelse af andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter i knoglemarv eller perifert blod).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg p. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturnæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig, for længerevarende undersøgelser er grænsedosis på 2 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over højst 14 dage og på 1 000 mg pr. kg legemsvægt pr. dag for behandlinger over mere end 14 dage. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

▼B

1.5.6. **Præparering af knoglemarv/blod**

Knoglemarvceller udtages normalt fra lårben eller skinneben umiddelbart efter aflivningen. Sædvanligvis udtages cellerne fra lårben eller skinneben, hvorefter de præpareres og farves med velkendte metoder. Perifert blod udtages fra halevenen eller et andet egnet blodkar. Blodlegemerne farves straks supravitalt (8) (9) (10), eller der fremstilles udstrygningspræparater, der derefter farves. Ved at bruge en DNA-specifik farvning (f.eks. acridinorange (14) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) kan man undgå nogle af de artifakter, der optræder ved ikke-DNA-specifik farvning. Denne fordel udelukker ikke, at der benyttes konventionelle farvestoffer (f.eks. Giemsa). Supplerende systemer (f.eks. cellulosekolonner til fjernelse af kerneindeholdende celler (16)) kan også benyttes, forudsat at de er påvist at fungere tilfredsstillende ved præparering af mikrokerner i laboratoriet.

1.5.7. **Analyse**

For hvert dyr bestemmes andelen af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal (umodne og modne) erythrocytter, idet der tælles mindst 200 erythrocytter i alt for knoglemarv og 1 000 erythrocytter for perifert blod (17). Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. For hvert dyr bedømmes mindst 2 000 umodne erythrocytter for forekomst af umodne etythrocytter med risikokerner. Der kan opnås yderligere information ved bedømmelse af modne erythrocytter for indhold af mikrokerner. Ved analyse af objektglas må andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter ikke være mindre end 20 % af kontrolværdien. Når dyrene behandles kontinuerligt i fire uger eller derover, kan også mindst 2 000 modne erythrocytter pr. dyr bedømmes for forekomst af mikrokerner. Systemer til automatisk analyse (billedanalyse og flow-cytometri af celleopslæmninger) er acceptable som alternativer til manuel evaluering, hvis de er behørigt begrundet og valideret.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af bedømte umodne erythrocytter, antallet af umodne erythrocytter med mikrokerne og antallet af umodne erythrocytter i forhold til det samlede antal erythrocytter. Hvis dyrene behandles kontinuerligt i mere end fire uger, anføres også dataene for modne erythrocytter, hvis de foreligger. Andelen af umodne erythrocytter i forhold til totale erythrocytter oplyses for hvert dyr, og, hvis det skønnes hensigtsmæssigt, procentdelen af erythrocytter med mikrokerne. Hvis der ikke er tegn på forskellig reaktion hos de to køn, kan dataene samles med henblik på statistisk analyse.

▼B

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med mikrokerner hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (18) (19). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af mikrokernetesten viser, at teststoffet fremkalder mikrokerner, som følge af beskadigelse af kromosomer eller mitoseapparat hos erythroblaster i den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder mikrokerner hos umodne erythrocytter i den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til det almindelige kredsløb eller specifikt til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

*TESTRAPPORT*

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr samt deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

▼B

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg. legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om fode- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til præparering af objektglas

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af umodne erythrocytter med mikrokerner

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— andel af umodne erythrocytter i forhold til total erythrocytter

— antal umodne erythrocytter med mikrokerner, anført særskilt for hvert dyr

— gennemsnit ± standardafvigelse for umodne erythrocytter med mikrokerner for hver gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— anvendte statistiske analyser og metoder

— data for sideløbende og tidligere negative kontrolprøver

— data for sideløbende positive kontrolprøver

— Diskussion af resultaterne

— Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Heddle, J.A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mulation Res., 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M, Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, Mutation Res. 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C, Salamone, M.F. and Heddie, J.A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, pp. 29-80.

▼B

(5) MacGregor, J.T. Schlegel, R. Choy. W.N., and Wehr, C.M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: Developments in Science and Practice of Toxicology, cd. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555-558.

(6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A., Hite. M., Margolin, G.H., Ramel, C, Salamone, M.F., Tice, R.R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, Mutation Res., 189, pp. 103-112.

(7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R. and Shelby, M.E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, Fund. Appl. Toxicol. 14, pp. 513-522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res. 245, pp. 245-249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS, Mutation Res., 278, pp. 83-98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 15 3-159.

(11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo,* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, Mutation Res., 312. pp. 293-304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, 10, pp. 313-319.

(13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis. 7, pp. 313-319.

(14) Hayashi, M., Sofuni, T, and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, pp. 241-247.

(15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Eriythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, Mutation Res. 120, pp. 269-275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 213, pp. 91-104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Res. 347, pp. 97-99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D.J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committe on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part 1, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.13/14. **MUTAGENICITET — TILBAGEMUTATIONSTEST MED BAKTERIER**

1. **METODE**

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. INDLEDNING

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der aminosyrekrævede stammer af Salmonella typhimurium og Escherichia coli til at påvise punktmutationer med substitution, addition eller deletion af et eller nogle få dna-basepar (1) (2) (3). Princippet i denne tilbagemutationstest med bakterier er, at den påviser mutationer, som tilbagemuterer mutationer i teststammerne og dermed sætter bakterien i stand til at syntetisere en essentiel aminosyre. Revertantbakterierne påvises ved deres evne til at vokse uden den aminosyre, som den oprindelige teststamme kræver.

Punktmutationer er årsagen til mange genetiske sygdomme hos mennesker, og der er meget, der tyder på, at punktmutationer i onkogener og tumorsuppressorgener i somatiske celler spiller en rolle for dannelse af tumorer hos mennesker og i forsøgsdyr. Tilbagemutationstesten med bakterier er hurtig, billig og forholdsvis let at udføre. Mange teststammer har forskellige egenskaber, der gør dem mere følsomme til påvisning af mutationer, bl.a. responsive dna-sekvenser på reversionsstedet, høj cellepermeabilitet for store molekyler og manglende dna-reparationssystemer eller forstærkede fejlbehæftede dna-reparationsprocesser. Teststammernes specificitet kan give nyttige oplysninger om, hvilke typer mutationer et gentoksisk stof inducerer. Der findes en meget stor database med resultater for en lang række strukturer med tilbagemutationstest med bakterier, og der er udviklet veletablerede metodologier for test af kemikalier med forskellige fysiske og kemiske egenskaber, herunder flygtige forbindelser.

Se også den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

En **tilbagemutationstest** med enten Salmonella typhimurium eller Escherichia coli påviser mutation i en aminosyrekrævende stamme (histidin eller tryptophan) til en stamme, der er uafhængig af tilførsel af aminosyren udefra.

**Mutagener for baseparsubstitution** er stoffer, der forårsager en baseændring i dna'et. I en tilbagemutationstest kan denne ændring ske samme sted som den oprindelige mutation eller et andet sted i bakteriens genom.

**Læserammemutagener** er stoffer, der medfører insertion eller deletion af et eller flere basepar i dna'et, således at RNA'ets læseramme ændres.

▼B

1.5. INDLEDENDE OVERVEJELSER

I tilbagemutationstesten med bakterier benyttes der prokaroytiske celler, som adskiller sig fra pattedyrceller med hensyn til f.eks. optagelse, metabolisme, kromosomstruktur og dna-reparationsprocesser. In vitro-test kræver normalt en exogen kilde til metabolismeaktivering. In vitro-metabolismeaktiveringssystemer kan ikke fuldstændig efterligne in vivo-forholdene i pattedyr. Testen vil derfor ikke give direkte oplysninger om et stofs mutagene og carcinogene potentiale i pattedyr.

Tilbagemutationstesten med bakterier anvendes generelt til en indledende screening for gentoksiske virkninger og, især, punktmutationsinducerende aktivitet. Det er ved hjælp af en omfattende database påvist, at mange kemiske stoffer, som giver positivt resultat i denne test, også har mutagen virkning i andre test. Der findes mutagene stolfer, der ikke er påvist ved denne test; årsagen hertil kan tilskrives det påviste endpoints specifikke karakter, forskelle i metabolismeaktivering og forskelle i biotilgængelighed. På den anden side kan faktorer, der øger tilbagemutationstestens følsomhed, føre til et for højt skøn over stoffets mutagene aktivitet.

Tilbagemutationstesten med bakterier kan være uegnet til evaluering af bestemte klasser af kemiske stoffer, f.eks. stærkt baktericide forbindelser (f.eks. visse antibiotika) og forbindelser, der antages (eller vides) at gribe specifikt ind i pattedyrcellers replikationssystem (f.eks. visse topoisomeraseinhibitorer og visse nucleosidanaloger). I sådanne tilfælde kan mutationstest i pattedyr være mere velegnede.

Selv om mange af de stoffer, der er positive i denne test, er kræftfremkaldende hos pattedyr, er korrelationen ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de virker via andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Opslæmninger af bakterieceller udsættes for teststoffet med og uden et exogent metabolismeaktiveringssystem. Ved pladeinkorporeringsmetoden blandes disse opslæmninger med en topagar og hældes ud på et minimalsubstrat. Ved præinkubationsmetoden inkuberes behandlingsblandingen, hvorefter den blandes med topagar inden udhældning på minimalsubstrat. For begge metoders vedkommende tælles revertantkolonierne efter to-tre dages inkubation, og der sammenlignes med antallet af spontane revertantkolonier på kontrolpladerne med opløsningsmiddel.

Der er beskrevet en række fremgangsmåder for udførelse af tilbagemutationstesten med bakterier, Blandt de mest almindeligt benyttede er pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4), præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuationsmetoden (9) (10) og suspensionsmetoden (11). Der er beskrevet modifikationer til test af gasser og dampe (12).

▼B

De i denne metode beskrevne fremgangsmåder vedrører især pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. De er begge acceptable til udførelse af forsøgene både med og uden metabolismeaktivering. Nogle stoffer, bl.a. kortkædede alifatiske nitrosaminer, divalente metaller, aldehyder, azofarvestoffer og diazoforbindelser, pyrollizidinalkaloider, allylforbindelser og nitroforbindelser (3), kan mest effektivt påvises ved præinkubationsmetoden. Det er også kendt, at visse klasser af mutagener ikke altid påvises ved standardmetoder som f.eks. pladeinkorporeringsmetoden og præinkubationsmetoden. Sådanne tilfælde bør betragtes som »særtilfælde«, og det anbefales kraftigt at anvende alternative metoder til påvisning i disse tilfælde. Følgende »særtilfælde« er konstateret (samt eksempler på fremgangsmåder, der kan benyttes til påvisning): azofarvestoffer og diazoforbindelser (3) (5) (6) (13), gasser og flygtige stoffer (12) (14) (15) (16) og glycosider (17) (18), Afvigelser fra standardmetoden skal begrundes sagligt.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Præparater**

1.5.1.1. *Bakterier*

Friske bakteriekulturer fremdyrkes til den sidste del af den eksponentielle fase eller til begyndelsen af den stationære fase (ca. $10^9$ celler pr. ml). Kulturer sidst i den stationære fase bør ikke benyttes. Det er vigtigt, at de kulturer, der benyttes i forsøgene, har et højt indhold af levedygtige bakterier. Titeren kan godtgøres enten ved hjælp af tidligere kontroldata for vækstkurver eller ved bestemmelse af antallet af levedygtige celler i det enkelte forsøg ved udpladning.

Som inkubationstemperatur anbefales 37 ºC.

Der skal benyttes mindst fem bakteriestammer, deriblandt fire stammer af S. typhimurium (TA1535; TA1537 eller TA97a eller TA97; TA98; og TA100), som er påvist at være pålidelige, og hvis respons er reproducerbar mellem laboratorier. Disse fire S. typhimurium-stammer har GC-basepar på de primære reversionssted, og det vides, at de ikke altid påviser visse oxiderende mutagener, tværbindende stoffer og hydraziner. Sådanne stoffer kan påvises med E. coli WP2-stammer eller S. typhimurium TA102 (19), som har AT-basepar på det primære reversionssted. Derfor kan følgende kombination af stammer anbefales:

— S. typhimurium TA 1535, og

— S. typhimurium TA 1537, TA97 eller TA97a, og

— S. typhimurium TA98, og

— S. typhimurium TA100, og

— E. coli WP2 uvrA, eller E. coli WP2 uvrA (pKM101) eller S. typhimurium TA102.

For at kunne påvise tværbindende mutagener kan det foretrækkes at vælge TA102 eller at tilføje en DNA-reparationsdygtig stamme af E. coli (f.eks. E. coli WP2 eller E. coli WP2 (pKM101)).

▼B

Der benyttes anerkendte metoder til stamkulturfremstilling, markørverifikation og opbevaring. For hver enkelt frosset kulturpræparat påvises den aminosyrebetingede vækst (histidin for S. typhimurium-stammer og tryptophan for E. coli-stammer). Andre fænotypiske egenskaber skal kontrolleres på lignende måde, således tilstedeværende eller manglende R-faktorplasmider, når det er relevant (dvs. ampicillinresistens hos TA98-stammen, TA-100- og TA97a- eller TA97-stammcn, WP2 uvrA-stammen og WP2 uvrA (pKM101)-stammen, samt ampicillin- og tetracyclinresistens hos TA102-stammen), tilstedeværelse af karakteristiske mutationer (dvs. rfa-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for krystalviolet og uvrA-mutation hos E. coli eller uvrB-mutation hos S. typhimurium ved hjælp af følsomhed over for ultraviolet lys) (2) (3). Stammerne skal ligeledes give kimtal for spontane revertanter inden for den hyppighed, der må forventes ud fra laboratoriets hidtidige kontroldata, og helst inden for den hyppighed, der er angivet i litteraturen.

1.5.1.2. *Substrat*

Der benyttes en egnet minimalagar (f.eks. med Vogel-Bonner minimalsubstrat E og glucose) og en topagar med histidin og biotin eller tryptophan, så der tillades nogle få celledelinger (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolismeaktivering*

Bakterierne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerede stoffer såsom Aroclor 1254 (1) (2) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (18) (20) (21). Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 5-30 % (v/v) i S9-blandingen. Valg af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration. For azofarvestoffer og diazoforbindelser kan et reduktivt metabolismeaktiveringssystem være mere velegnet (6) (13).

1.5.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af bakterierne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

Der må ikke være mistanke om, at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof skal være kompatibel med bakteriernes overlevelse og S9-aktiviteten (22). Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie.

▼B

1.5.2. **Testbetingelser**

1.5.2.1. *Teststammer (se punkt 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Eksponeringskoncentration*

Stoffets cytotoksicitet og dets opløselighed i den endelige testblanding er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme toksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg. Cytotoksicitet kan påvises ved et fald i antallet af revertantkolonier, ved en opklaring eller hæmning af baggrundsvæksten eller ved graden af overlevelse i de behandlede kulturer. Et stofs cytotoksicitet kan ændres ved, at der er metabolismeaktiveringssystemer til stede. Uopløselighed bedømmes ved, at der med det blotte øje kan iagttages udfældning i slutblandingen under de faktiske forsøgsbetingelser.

Der anbefales en maksimal testkoncentration af opløselige ikke-cytotoksiske stoffer på 5 mg/plade eller 5 µl/plade. For ikke-cytotoksiske stoffer, der ikke er opløselige med 5 mg/plade eller 5 µl/plade, skal en eller flere af de undersøgte koncentrationer være uopløselig i slutblandingen. Teststoffer, der er cytotoksiske allerede under 5 mg/plade eller 5 µl/plade. testes op til den cytotoksiske koncentration. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

Der benyttes mindst fem forskellige analyserbare koncentrationer af teststoffer med en afstand på ca. en halv logaritme (√10) mellem koncentrationerne i det indledende forsøg. Ved undersøgelse af en koncentration/respons-sammenhæng kan mindre intervaller være hensigtsmæssigt. Test ved koncentrationer over 5 mg/plade eller 5 µl/plade kan tages under overvejelse, når bedømmelsen vedrører stoffer med et betydeligt indhold af potentielt mutagene urenheder.

1.5.2.3. *Negative og positive kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) stammespecifikke kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering. Der vælges en sådan koncentration i den positive kontrol, at det enkelte forsøg effektivitet godtgøres.

Ved forsøg med metabolismeaktivering udvælges positive kontrolreferencestoffer ud fra den valgte type bakteriestamme.

Nedenfor er der eksempler på stoffer, som er egnede som positive kontrolstoffer i forsøg med metabolismeaktivering:

| CAS nr. | Einecs nr. | Stof |
|---|---|---|
| 781-43-1 | 212-308-4 | 9,10-dimethylanthracen |
| 57-97-6 | 200-359-5 | 7,1 2-dimethylbenz[*a*]anthracen |
| 50-32-8 | 200-028-5 | benzo[a]pyren |
| 613-13-8 | 210-330-9 | 2-aminoanthracen |

▼B

| CAS nr. | Einecs nr. | Stof |
|---|---|---|
| 50-18-0 | | cyclophosphamid |
| 6055-19-2 | 200-015-4 | cyclophosphamidmonohydrat |

Følgende stof er egnet som positivt kontrolstof ved reduktiv metabolismeaktivering:

| CAS nr. | Einecs nr. | Stof |
|---|---|---|
| 573-58-0 | 209-358-4 | Congo-rødt |

2-aminoanthracen bør ikke anvendes som eneste indikator for, om .S9-blandingen er effektiv. Hvis der benyttes 2-aminoanthracen, skal hver batch af S9 tillige karakteriseres med et mutagen, der kræver metabolismeaktivering med mikrosomenzymer, f.eks, benzo[a]pyren eller dimethylbenzanthracen.

Nedenfor er der eksempler på stoffer til brug som stammespecifikke positive kontrolstoffer i forsøg uden exogen metabolismeaktivering:

| CAS nr. | Einecs nr. | Stof | Stamme |
|---|---|---|---|
| 26628-22-8 | 247-852-1 | natriumazid | TA 1535 og TA 100 |
| 607-57-8 | 210-138-5 | 2-nitrofluoren | TA 98 |
| 90-45-9 | 201-995-6 | 9-aminoacridin | TA 1537, TA 97 og TA 97a |
| 17070-45-0 | 241-129-4 | ICR 191 | TA 1537, TA 97 og TA 97a |
| 80-15-9 | 201-254-7 | cumenbydroperoxid | TA 102 |
| 50-07-7 | 200-008-6 | mitomycin C | WP2 uvrA og TA 102 |
| 70-25-7 | 200-730-1 | N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin | WP2, WP2 uvrA og WP2 uvrA (pKM101) |
| 56-57-5 | 200-281-1 | 4-nitroquinolin-l-oxid | WP2, WP2 uvrA og WP2 uvrA (pKM101) |
| 3688-53-7 | | furylfuramid (AF2) | plasmidholdige stammer |

Der kan benyttes andre egnede referencestoffer til positiv kontrol. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

Der skal indgå negative kontrolprøver, der kun består af opløsningsmiddel eller bærestof uden teststof, og som behandles på samme måde som de øvrige testgrupper. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

▼B

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Ved pladeinkorporeringsmetoden (1) (2) (3) (4) uden metabolismeaktivering blandes normalt 0,05 ml eller 0,1 ml testopløsning, 0,1 ml frisk bakteriekultur (indeholdende ca. $10^8$ levedygtige celler) og 0,5 ml steril buffer med 2,0 ml topagar. Ved forsøg med metabolismeaktivering blandes normalt ca. 0,5 ml metabolismeaktiveringsblanding, indeholdende en passende mængde postmitokondriefraktion (5-30 % (v/v) i metabolismeaktiveringsblandingen), med topagaren (2,0 ml), bakterierne og teststoffet/testopløsningen. Indholdet i de enkelte glas blandes og hældes ud over overfladen på en minimalagarplade. Topagaren henstilles til størkning inden inkubering.

Ved præinkubationsmetoden (2) (3) (5) (6) forinkuberes teststof/testopløsning sammen med teststammen (indeholdende ca. $10^8$ levedygtige celler) og steril buffer eller metabolismeaktiveringssystemet (0,5 ml) normalt i 20 minutter ved 30-37 °C, inden der blandes med topagaren, og blandingen hældes ud på overfladen af en minimalagarplade. Normalt blandes 0,05 ml eller 0,1 ml teststof/testopløsning, 0,1 ml bakteriekultur og 0,5 ml S9-blanding eller steril buffer med 2,0 ml topagar. Glassene bør under forinkuberingen beluftes i rysteapparat.

Til forsvarlig bestemmelse af variationen udføres der tredobbelt udpladning ved hvert dosisniveau. Dobbelt udpladning kan accepteres, hvis den begrundes sagligt. Tab af en plade af og til gør ikke nødvendigvis testen ubrugelig.

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubering**

Alle plader i hvert forsøg inkuberes ved 37 °C i 48-72 timer. Efter inkuberingen tælles antallet af revertantkolonier pr. plade.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene forelægges som antallet af revertantkolonier pr. plade. Også antallet af revertantkolonier på både negative (opløsningsmiddelkontrol og en eventuel ubehandlet kontrol) og positive kontrolplader oplyses. Tallene for hver enkelt plade, gennemsnittet af revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen opgives for teststoffet og for positive og negative kontrolplader (ubehandlede og/eller med opløsningsmiddel).

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendige, skal dette begrundes. Ved opfølgende forsøg kan man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er koncentrationernes spredning, behandlingsmetoden (pladeinkorporering eller væske-præinkubation) og metabolismeaktiveringen.

▼B

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade i det undersøgte interval og/eller en reproducerbar forøgelse af antallet af revertantkolonier pr. plade ved en eller flere koncentrationer, for mindst én stamme med eller uden metabolismeaktivering (23). Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (24). Statistisk signifikans bør dog ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en tilbagemutationstest med bakterier viser, at teststoffet fremkalder punktmutationer ved basesubstitution eller læserammeforskydning i genomet hos Salmonella typhimurium og/eller Escherichia coli. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke er mutagent i den undersøge organisme.

3. **RAPPORTERING**

*TESTRAPPORT*

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Stammer:

— anvendte stammer

— antal celler pr. kultur

— karakteristika for stammen

Testbetingelser:

— mængde teststof pr. plade (mg/plade eller µl/plade) med begrundelse for valg af dosis og pladeantal pr. koncentration

— anvendte substrater

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— behandlingsmetoder

Resultater:

— tegn på toksicitet

— tegn på udfældning

— kimtal for de enkelte plader

▼B

— gennemsnitligt antal revertantkolonier pr. plade og standardafvigelsen

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D.M. and Arnes, B.N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res. 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt. S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L.D., Brusick, D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans. K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V. (1986). The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency GeneTox Program, Mutation Res., 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto. Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse. D.G. Rowland. I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (198 7), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, J. food Safety. 8. pp. 167-177.

(9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, Mutations Res., 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, \V. and Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium,* Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M.]., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughan, V.L. (1984), Mutagenicity of Benzidinc and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, Environ. Mol. Mutagen. 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R.G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in Progress in Genetic Toxicology. D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.,G. and Claxton, L.D, (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis. 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A. Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salomonella typhimurium*. Cancer Res., 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Arnes, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dictary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wcdd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella lyphimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, Mutagenesis, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Tatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in viiro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Arnes, B.N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/ Microsome Test, Mutation Res., 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L.D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G.A.T. Green, M.H.L, Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼B

B.15. **MUTAGENICITETSTESTNING OG SCREENING FOR KARCINOGENICITET GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

En række forskellige haploide og diploide stammer af gæren *Saccharomyces cerevisiae* kan anvendes ved undersøgelse af genmutationer, som induceres af kemiske stoffer med og uden metabolisk aktivering.

Man har anvendt fremadmutationssystemer med haploide stammer f.eks, ved bestemmelse af mutation fra røde, adeninafhængige mutanter (ade-1, ade-2) til dobbelt adeninafhængige hvide mutanter og selektive systemer som induktion af canavanin-resistens og cycloheximid-resistens.

Det bedst validerede tilbagemutationssystem bygger på anvendelse af den haploide stamme XV185-14C, der er bærer af ochre nonsense-mutationerne ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 og trp 5-48, og som muterer tilbage med baseparsubstitutionsmutagener, der inducerer punktmutationer eller ochre suppressormutationer. XV185-14C er også bærer af his 1-7 markøren, som er en missense-mutation, der hovedsagelig muterer tilbage ved mutationer i andre loci, og markøren hom 3-10, der muterer tilbage med frameshift-mutagener.

Den eneste bredt anvendte diploide stamme af S. cerevisiae er $D_7$, der er homozygot i ilv 1-92.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Opløsninger af teststof og kontrol fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende vehikel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

▼B

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem.

Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, postmitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

*Forsøgsbetingelser*

Teststammer

Den haploide stamme XV 185-14C og den diploide stamme $D_7$ er de hyppigst anvendte i genmutationsundersøgelser. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og antal mutanter anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra stof til stof.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30 °C i mørke.

Spontane mutationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mutationsfrekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

▼B

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved genmutation, og af cellernes levedygtighed. Når man tester markører, der som hom 3-10 har en lav mutationsfrekvens, må antallet af plader forøges, således at der kan tilvejebringes en statistisk relevant mængde data.

*Fremgangsmåde*

Stammer af S. cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationærfase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase, 1-5 × $10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37 °C under omrystning. Hvis det er nødvendigt, tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem under eksponeringen. Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af genmutationer og antal overlevende på hver plade. Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationærfase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelsesfrekvens samt mutationsfrekvens angives. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg, Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal mutanter, overlevelses- og mutationsfrekvens, om muligt dosis-responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.16. **MITOTISK REKOMBINATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Der kan hos Saccharomyces cerevisiae konstateres mitotisk rekombination mellem gener (eller mere generelt mellem et gen og dets centromer) og inden for det samme gen. Den førstnævnte form kaldes mitotisk overkrydsning og frembringer reciprokke typer, mens den sidstnævnte som oftest ikke er reciprok og kaldes genbytning. Overkrydsning bestemmes almindeligvis ved frembringelse af recessive homozygote kolonier eller sektorer i en heterozygot stamme, mens genbytning bestemmes ved frembringelse af prototrofe revertanter i en auxotrof heteroallel stamme, som bærer to forskellige, defekte alleler af det samme gen. De hyppigst anvendte stammer ved undersøgelse af mitotisk genbytning er $D_4$ (med heteroallele ade 2 og trp 5), $BZ_{34}$ (med heteroallel arg 4), $D_7$ (med heteroallel trp 5) og $JD_1$ (med heteroallele his 4 og trp 5). Mitotisk overkrydsning, som frembringer røde og lyserøde sektorer, kan undersøges i $D_5$ og $D_7$ (der også kan bruges til bestemmelse af mitotisk genbytning og tilbagemutation af ilv 1-92), idet begge stammer bærer heteroallele komplementære alleler til ade 2.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Opløsninger af teststof og kontrol- eller referencestoffer fremstilles umiddelbart inden testen under anvendelse af et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes organiske kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, kan organiske opløsningsmidler som ætanol, acetone eller dimetylsulfoxid (DMSO) bruges i koncentrationer på op til 2 % v/v. Koncentrationen af vehiklet bør ikke medføre nogen ændring i cellevitalitet og vækstkarakteristika.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststof både med og uden tilsætning af et passende eksogent metabolisk aktiveringssystem. Det hyppigst anvendte system består af en co-faktorberiget postmitochondrisk fraktion af lever fra gnavere, som er forbehandlede med enzyminducerende stoffer. Andre dyrearter, væv, postmitochondriske fraktioner eller fremgangsmåder kan også være egnede til metabolisk aktivering.

▼B

*Forsøgsbetingelser*

Teststammer

De hyppigst anvendte stammer er de diploide $D_4$, $D_5$, $D_7$ og $JD_1$. Også andre stammer kan være egnede.

Medier

Ved bestemmelse af overlevelsesgrad og mitotisk rekombinationsfrekvens anvendes passende kulturmedier.

Negative og positive kontroller

Sideløbende med testkulturerne dyrkes positive kontrolkulturer, ubehandlede kontrolkulturer og kontrolkulturer med det anvendte opløsningsmiddel. Der anvendes egnede positive kontrolstoffer for hvert enkelt genetisk endpoint.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst fem forskellige koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Herunder må man tage hensyn til faktorer som cytotoksicitet og opløselighed. De laveste koncentrationer bør ikke have nogen indvirkning på cellernes levedygtighed. Når der testes toksiske stoffer, bør den højeste koncentration ikke reducere overlevelsesgraden til mindre end 5 til 10 %. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler i stationær fase eller vækstfase kan eksponeres for teststoffet i op til 18 timer. Benyttes der lange eksponeringsperioder, bør kulturerne dog undersøges mikroskopisk for sporedannelse, idet disses tilstedeværelse gør testen værdiløs.

Inkubationsbetingelser

Pladerne inkuberes i fire til syv dage mellem 28 og 30 °C i mørke. Plader, som anvendes til bestemmelse af røde og lyserøde homozygote sektorer, der er frembragt ved mitotisk overkrydsning, opbevares i køleskab (omkring 4 °C) i yderligere en til to dage inden optælling for at muliggøre udvikling af de rene pigmenterede kolonier.

Spontane mitotiske rekombinationsfrekvenser

Der anvendes subkulturer med spontane mitotiske frekvenser, som ligger inden for de almindeligt accepterede områder.

▼B

Antal parallelle plader

Der anvendes mindst tre parallelle plader for hver koncentration ved bestemmelsen af prototrofer, som er fremkommet ved mitotisk genbytning, og af cellernes levedygtighed. Når man tester recessive homozygoter, som er frembragt ved mitotisk overkrydsning, forøges antallet af plader, således at der opnås et passende antal kolonier.

*Fremgangsmåde*

Stammer af S. cerevisiae eksponeres normalt ved test i væske, hvortil der anvendes enten celler i stationær fase eller celler i vækstfase. Indledende undersøgelser bør udføres med celler i vækstfase. 1-5 × $10^7$ celler pr. ml eksponeres for teststoffet i op til 18 timer ved 28 til 37 °C under omrystning. Under eksponeringen tilsættes en passende mængde metabolisk aktiveringssystem.

Efter eksponeringen centrifugeres og vaskes cellerne, hvorefter de udsås på et egnet kulturmedium. Når inkubationen er slut, registreres induktionen af mitotisk rekombination og antal overlevende på hver plade.

Hvis den første undersøgelse er negativ, bør en anden udføres under anvendelse af celler i stationær fase. Hvis den første undersøgelse er positiv, skal det efterprøves i et passende uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform. Antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelsesgrad samt rekombinationsfrekvens angives.

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte stamme

— forsøgsbetingelser: celler i stationær fase eller vækstfase, mediernes sammensætning, inkubationstemperatur og -periode, metabolisk aktiveringssystem

— eksponeringsbetingelser: eksponeringskoncentrationer, fremgangsmåde og varighed, eksponeringstemperatur, positive og negative kontroller

— antal optalte kolonier, antal rekombinanter, overlevelses- og rekombinationsfrekvens, om muligt dosis/responsforhold, statistisk evaluering af data

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

▼B

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

## B.17. MUTAGENICITET — IN VITRO-TEST FOR GENMUTATION I PATTEDYRCELLER

### 1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 476 In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

### 1.1. INDLEDNING

In vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan benyttes til at påvise genmutationer, som induceres af kemiske stoffer. Blandt egnede cellelinjer er muselymfomceller L5178Y, cellelinjerne CHO, CHO-AS52 og V79 fra kinesisk hamster og humane lymfoblastceller TK6 (1). I disse cellelinjer benyttes som genetiske endpoints almindeligvis bestemmelse af mutationer ved thymidin-kinase (TK), hypoxantin-guanin-fosforibosyl-transferase (HPRT) og et transgen af xanthin-guanin-fosforibosyl-transferase (XPRT). I TK-, HPRT- og XPRT-mutationstestene påvises forskellige spektre af genetiske hændelser. Med TK og XPRT kan der på grund af deres autosomale placering påvises genetiske hændelser (f.eks. større deletioner), der ikke kan påvises ved HPRT-locus'et på X-kromosomer (2) (3) (4) (5) (6).

I in vitro-testen for genmutation i pattedyrceller kan der benyttes kulturer af etablerede cellelinjer eller cellestammer. Cellerne udvælges på grundlag af deres vækstegenskaber ved dyrkning og den spontane mutationsfrekvens' stabilitet.

Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en exogen metabolismeaktivering. Et sådant metabolismeaktiveringssystem kan ikke fuldstændigt efterligne forholdene i pattedyr in vivo. Man må omhyggeligt undgå forhold, der fører til resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet. Positive resultater, der ikke afspejler egentlig mutagenicitet, kan være forårsaget af ændringer i pH eller osmolalitet eller høj cytotoksicitet (7).

Testen benyttes til screening for stoffer, der kan være mutagene eller carcinogene hos pattedyr. Mange af de stoffer, der er positive ved denne test, er carcinogene hos pattedyr, men korrelationen mellem denne test og carcinogenicitet er ikke fuldstændig. Den afhænger af den kemiske klasse, og stadig mere tyder på, at der findes carcinogener, der ikke påvises ved denne test, fordi de tilsyneladende virker gennem andre ikke-gentoksiske mekanismer eller mekanismer, der ikke findes i bakterieceller (6).

Se også den generelle indledning til del B.

### 1.2. DEFINITIONER

**Fremadmutation:** En genmutation fra forældretypen til mutanten, som medfører ændring i eller tab af det kodede proteins enzymaktivitet.

**Basesubstitutionsmutagen:** Et stof, der fremkalder substitution af et eller flere DNA-basepar.

**Læserammemutagen:** Et stof, der fremkalder addition eller deletion af et eller flere basepar i DNA-molekylet.

▼B

**Fænotypeekspressionsperiode:** Et tidsrum, hvorunder uændrede genprodukter gradvis forsvinder fra nylig muterede celler.

**Mutanthyppighed:** Antallet af observerede mutantceller divideret med antallet af levedygtige celler.

**Relativ total vækst:** Forøgelsen af celleantallet i et tidsrum, sammenlignet med en kontrolpopulation af celler: beregnes som produktet af suspensionsvæksten i forhold til den negative kontrol og klondannelseseffektiviteten i forhold til den negative kontrol.

**Relativ suspensionsvækst:** Forøgelsen af celleantallet i ekspressionsperioden i forhold til den negative kontrol.

**Levedygtighed:** De behandlede cellers klondannelseseffektivitet på tidspunktet for selektiv udpladning efter ekspressionsperioden.

**Overlevelse:** De behandlede cellers klondannelseseffektivitet ved udpladningen efter behandlingsperioden; overlevelsen udtrykkes normalt i forhold til overlevelsen i kontrolcellepopulationen.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Celler, som mangler thymidinkinase TK på grund af fremadmutationen $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, er resistente over for de cytotoksiske virkninger af pyridinanalogen trifluorthymidin (TFT). Celler, som har thymidinkinase, er følsomme over for TFT, som inhiberer cellemetabolismen og standser den videre celledeling. Det betyder, at mutantceller kan formere sig under tilstedeværelse af TFT, mens normale celler, der indeholder thymidinkinase, ikke kan. På tilsvarende måde kan celler, der mangler HPRT eller XPRT, udvælges ved deres modstandsdygtighed over for henholdsvis 6-thioguanin (TG) og 8-azaguanin (AG). Hvis der i en af genmutationstestene med pattedyrceller testes et stof, der er baseanalogt med det selektive stof eller beslægtet hermed, må der først ses nøje på teststoffets egenskaber. Eksempelvis bør enhver mistanke om, at teststoffet har selektiv toksicitet over for mutantceller og ikke-mutantceller, undersøges. Det vil sige, at det selektive system/stofs egnethed skal bekræftes, når der testes stoffer, der kemisk er beslægtet med det selektive stof (8).

Celler i suspensionskultur eller enkeltlagskultur udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering i et passende tidsrum, hvorefter der ved dyrkning i subkultur påvises cytotoksicitet og gives mulighed for fænotypeekspression, inden mutanterne udvælges (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoksiciteten bestemmes sædvanligvis ved at måle kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller deres relative totale vækst efter behandlingsperioden. De behandlede kulturer holdes så lang tid i vækstmediet, afhængigt af hvert valgt locus og celletype, at fænotypeekspressionen af inducerede mutationer bliver næsten optimal. Mutanthyppigheden bestemmes ved udsåning af et kendt antal celler i et medium, der indeholder det selektive stof, til påvisning af mutantceller og i et medium uden selektivt stof til bestemmelse af klondannelseseffektiviteten (levedygtigheden). Efter en passende inkuberingstid tælles kolonierne. Mutanthyppigheden afledes af antallet af mutantkolonier i det selektive medium og antallet af kolonier i det ikke-selektive medium.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Celler*

En lang række cellelinjer lader sig anvende i denne test, herunder subkloner af L5178Y, CHO, CHO-AS52, V-79 og TK6-celler. For de celletyper, der benyttes i denne test, bør der være påvist følsomhed over for kemiske mutagener, høj klondannelseseffektivitet og stabil spontan mutationshyppighed. Cellerne bør kontrolleres for forurening med mycoplasma og bør ikke anvendes, hvis de er forurenet.

Testen bør tilrettelægges med forud fastlagt følsomhed og styrke. Antallet af celler, kulturer og koncentrationer af teststof bør afspejle disse valgte parametre (14). Det mindste antal levedygtige celler, der overlever behandling og benyttes i testens faser, baseres på den spontane mutationshyppighed. Som rettesnor kan der anvendes et celleantal, der er mindst ti gange den reciprokke spontane mutationshyppighed. Det anbefales dog, at der mindst anvendes$10^6$ celler. Der skal foreligge tilstrækkelige historiske data om cellesystemet til at dokumentere, at testen har konstant høj effektivitet.

1.4.1.2. *Medier og dyrkningsbetingelser*

Der benyttes egnede dyrkningsmedier og inkuberingsbetingelser (dyrkningsbeholdere. temperatur, $CO_2$-koncentration, luftfugtighed). Medier vælges efter, hvilke selektive systemer og celletyper der benyttes i testen. Det er især vigtigt at vælge sådanne dyrkningsbetingelser, at både mutantcellers og ikke-mutantcellers vækst og kolonidannelse bliver optimal under ekspressionsperioden.

1.4.1.3. *Fremstilling af kulturer*

Cellerne opformeres fra stamkulturer, udsås i dyrkningsmedium og inkuberes ved 37 ºC. Det kan være nødvendigt at rense kulturerne for allerede-eksisterende mutanter, inden de benyttes i denne test.

1.4.1.4. *Metabolismeaktivering*

Cellerne udsættes for teststoffet både med og uden et egnet metabolismeaktiveringssystem. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (19) (20).

Postmitokondriefraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Valget af metabolismeaktiveringssystem og dets beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører. I nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte postmitokondriefraktion i mere end én koncentration.

▼B

Nogle udviklingstendenser, f.eks. genetisk konstruktion af cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer, kan rumme potentiale for endogen aktivering. Valget af en bestemt cellelinje skal begrundes sagligt (f.eks. ved, at cytochrom P450-coenzymet er relevant for teststoffets metabolisme).

1.4.1.5. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende inden behandling af cellerne. Teststoffer i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet eller fortyndes inden behandlingen. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Der må ikke være mistanke om. at opløsningsmiddel/bærestof reagerer kemisk med teststoffet, og opløsningsmiddel/bærestof må hverken hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten. Benyttes der andre opløsningsmiddel/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem. Ved undersøgelse af stoffer, der er ustabile i vand, skal de organiske opløsningsmidler være vandfrie. Vand kan fjernes ved tilsætning af molekylsi.

1.4.2.2. *Eksponeringskoncentrationer*

Stoffets cytotoksicitet, dets opløselighed i testsystemet samt ændringer i pH og osmolalitet er blandt de kriterier, der skal tages hensyn til ved valg af højeste koncentration.

Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolismeaktivering i hovedforsøget ved hjælp af en passende indikator for celleintegritet og -vækst, f.eks. relativ klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relativ total vækst. Det kan være hensigtsmæssigt at bestemme cytotoksicitet og opløselighed ved et indledende forsøg.

Der benyttes mindst fire analyserbare koncentrationer. Hvis der er tale om cytotoksicitet, skal koncentrationerne dække et interval fra største toksicitet til ringe eller ingen toksicitet; det betyder normalt, at koncentrationerne højst er adskilt med en faktor mellem 2 og $\sqrt{10}$. Hvis den højeste koncentration er baseret på cytotoksicitet, bør den føre til en relativ overlevelse (relativ klondannelseseffektivitet) eller relativ total vækst på ca. 10-20 % (ikke under 10 %). For stoffer, der er forholdsvis ikke-cytotoksiske, må testkoncentrationen højst være 5 mg/ml, 5 µl/ml eller 0,01 M (den laveste af de tre).

▼B

Forholdsvis uopløselige stoffer testes op til eller over opløselighedsgrænsen ved dyrkningsbetingelserne. Tegn på uopløselighed bør konstateres i det endelige behandlingsmedium, som cellerne udsættes for. Det kan være hensigtsmæssigt at bedømme opløseligheden både ved behandlingens begyndelse og afslutning, eftersom opløseligheden kan ændre sig under eksponeringen i testsystemet som følge af, at der er celler, S9, serum mv. til stede. Uopløselighed kan iagttages med det blotte øje. Bundfald må ikke have indflydelse på bedømmelsen.

1.4.2.3. *Kontrolprøver*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver, såvel med som uden metabolismeaktivering, Når der benyttes metabolismeaktivering, bør der som positivt kontrolkemikalie anvendes et, der kræver aktivering for at virke mutagent.

Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer.

| Metabolismeaktivering | Locus | Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|---|---|
| Ingen exogen metabolismeaktivering | HPRT | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | Ethylnitrosourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| | TK (små og store kolonier) | Methylmethansulfonat | 66-27-3 | 200-625-0 |
| | XPRT | Ethylmethansulfonat | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | Ethylnitrosourea | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Exogen metabolismeaktivering | HFRT | 3-methylcholanthren | 56-49-5 | 200-276-4 |
| | | N-nitrosodimethylamin | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | 7,1 2-dimethylbenzanthracen | 57-97-6 | 200-359-5 |
| | TK (små og store kolonier) | Cyclophosphamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| | | Cyclophosphamidmonohydrat | 6055-19-2 | |
| | | Benzo[*a*]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | | 3-methylcholanthren | 56-49-5 | 200-276-5 |
| | XPRT | N-nitrosodimethylamin (ved højt indhold af S9) | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | Benzo[*a*]pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |

Der kan benyttes andre egnede stoffer til positiv kontrol, f.eks. kan et laboratorium, der har en historisk database over 5-brom-2'-deoxyuridin (CAS nr. 59-14-3, Einecs nr. 200-415-9), også benytte dette referencestof. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer.

▼B

Der skal indgå negative kontrolprøver, hvor behandlingsmediet kun består af opløsningsmiddel eller bærestof, og som behandles på samme måde som de øvrige kulturer. Desuden skal der være ubehandlede kontrolprøver, medmindre der foreligger tidligere opnåede kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

1.4.3.1. *Behandiing med teststof*

Celler under formering udsættes for teststoffet både med og uden metabolismeaktivering. Eksponeringen skal vare en passende tid (normalt har tre-fem timer den fornødne virkning). Eksponeringen kan strække sig over én eller flere cellecyklusser.

Ved hver undersøgt koncentration benyttes der enten en eller to behandlede kulturer. Benyttes der kun én kultur, øges antallet af koncentrationer, således at der bliver tilstrækkeligt mange kulturer til analyse (dvs. mindst otte analyserbare koncentrationer). Der bør anvendes to negative kontrolkulturer (opløsningsmiddel).

Gasformige og flygtige stoffer testes ved en egnet metode, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (21) (22).

1.4.3.2. *Måling af overlevelse, levedygtighed og mutanthyppighed*

Efter eksponeringen vaskes cellerne og dyrkes med henblik på at bestemme overlevelsen og give mulighed for ekspression af mutantfænotypen. Måling af cytotoksicitet ved bestemmelse af kulturernes relative klondannelseseffektivitet (overlevelse) eller relative totale vækst påbegyndes normalt efter behandlingsperioden.

Hvert locus har et fast mindste tidsrum, som kræves til nær optimal fænotypeekspression af nyligt inducerede mutanter (HPRT og XPRT kræver mindst seks-otte dage og TK mindst to dage). Cellerne dyrkes i medier med og uden selektivt stof med henblik på bestemmelse af henholdsvis antallet af mutanter og klondannelseseffektiviteten. Måling af levedygtigheden (der benyttes til beregning af mutanthyppigheden) påbegyndes efter ekspressionstiden ved udpladning på ikke-selektivt medium.

Hvis teststoffet reagerer positivt i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i mindst en af testkulturerne (den højeste positive koncentration) og i de positive og negative kontrolkulturer. Hvis teststoffet reagerer negativt i L517SY $TK^{+/-}$-testen, bestemmes kolonistørrelsen i de positive og negative kontrolkulturer. Også ved undersøgelser med TK6$TK^{+/-}$ kan kolonistørrelsen bestemmes.

▼B

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene skal omfatte bestemmelse af cytotoksicitet og levedygtighed, kimtælling og mutanthyppighed for de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. I tilfælde af positiv reaktion i L5178Y $TK^{+/-}$-testen, bedømmes kolonierne ud fra kriterier om små og store kolonier ved mindst én koncentration af teststoffet (højeste positive koncentration) og med den negative og positive kontrol. Den molekylære og cytogenetiske natur af mutanter i både store og små kolonier er udforsket detaljeret (23) (24). I $TK^{+/-}$-testen bedømmes kolonierne efter kriterier for normalt voksende (store) og langsomt voksende (små) kolonier (25). De mutantceller, der har de mest alvorlige genetiske skader, har længere fordoblingstider og danner derfor mindre kolonier. Sådanne skader ligger typisk fra tab af hele genet til karyotypisk synlige kromosomaberrationer. Induktion af mutanter i små kolonier har været tilskrevet kemikalier, der fremkalder kromosomaberrationer, der kan ses med det blotte øje (26). Mindre alvorligt berørte mutantceller vokser med omtrent samme hastighed som modercellerne og danner store kolonier.

Overlevelsen (den relative klondannelseseffektivitet) eller den relative totale vækst skal oplyses. Mutanthyppigheden opgives som antallet af mutantceller i forhold til antallet af overlevende celler.

Der anføres data for hver enkelt kultur. Derudover sammenfattes alle data i tabelform.

Der findes ingen krav til verifikation af et klart positivt resultat. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere undersøgelser, helst med ændrede forsøgsbetingelser. Negative resultater bekræftes efter en vurdering af de enkelte tilfælde. Anses bekræftelse af negative resultater ikke for nødvendigt, skal dette begrundes. Ved forsøg til opfølgning af tvetydige eller negative resultater bør man overveje at ændre på undersøgelsens parametre, så de bedømte forsøgsbetingelser udvides. Blandt de undersøgelsesparametre. der kan ændres på, er koncentrationernes spredning og metabolismeaktiveringen.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING Af RESULTATER

Der findes en række kriterier for, om der er opnået et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig eller reproducerbar forøgelse af mutanthyppigheden. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i denne test.

▼B

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vitro-test for genmutation i pattedyrceller viser, at teststoffet fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller. En positiv koncentrationsafhængig reproducerbar respons er mest sigende. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder genmutationer i de benyttede dyrkede pattedyrceller.

3. **RAPPORTERING**

*TESTRAPPORT*

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes.

Celler:

— celletype og -ilde

— antal cellekulturer

— eventuelt antal passager

— eventuelle metoder til vedligehold af cellekultur

— fravær af mycoplasma

Testbetingelser:

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder f.eks. eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel $CO_2$-koncentration

— teststoffets koncentration

— volumen af tilsat bærestof og teststof

— inkuberingstemperatur

— inkuberingstid

— behandlingens varighed

— celletæthed under behandlingen

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— positive og negative kontrolprøver

▼B

— ekspressionsperiodens længde (herunder antal udsåede celler, subkulturer og eventuel feeding)

— selektive agenser

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

— metoder til tælling af levedygtige celler og mutantceller

— definition af kolonier, hvor størrelse og type lægges til grund (herunder kriterier for, hvilke kolonier der er »små« og »store«)

Resultater:

— tegn på toksicitet

— tegn på udfældning

— data om pH og osmolalitet under udsættelsen for teststoffet, hvis disse værdier er målt

— kolonistørrelse, hvis den er bedømt, i hvert fald for negative og positive kontrolkulturer

— laboratoriets kapacitet til at påvise mutanter i små kolonier med L 5178Y $TK^{+/-}$-systemet

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— mutanthyppighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (eds.) (1987), Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro,* Proc. Natl. Acad. Sri. USA, 61, pp. 1306-1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, Mutation Res., 94, pp. 467-485.

(4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, Mutagenesis, 4, pp. 394-403.

▼B

(5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, Mutation Res., 223, pp. 121-128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M, Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, pp. 235-239.

(7) Scott. D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, pp. 147-204.

(8) Clive, D., McCuen, R. Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 115, pp. 225-251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, pp. 17-36.

(10) Li. A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C, Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Cuanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, Mutation Res., 189, pp. 135-141.

(11) Liber, H.I., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Lod in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, Mutation Res. 216, pp. 9-17.

(12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and 1CR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, Mutation Res., 160, pp. 133-147.

(13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M, Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland D.J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, Mutation Res., 46, pp. 36 5-37 3.

(16) Arnes, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res. 31, pp. 347-364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, Mutat Res., 59, pp. 61-108.

(18) Maron, D.M. and Arnes, B.N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, pp. 173-215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.C, Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, pp. 175-177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot. R.M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R.R., Costa, D.L, Schaich, K.M, (eds.), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, pp. 91-103.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, pp. 795-801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, Proc. Natl. Acad. Sti. USA. 87, pp, 51-55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C. Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT$^{r}$) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res. 151, pp. 161-174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and I.ittle, J.B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, Mutation Res., 229, pp. 89-102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, Mutagenesis 5, pp.609-614.

▼B

B.18. **DNA-SKADE OG DNA-REPARATION — UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS — PATTEDYRCELLER IN VITRO**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Ved Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test undersøges dna-reparationen efter bortskæring og fjernelse af skader, som er induceret af kemiske eller fysiske agentia. Testen bygger på inkorporering af tritiummærket thymidin ($^{3}$H-TdR) i pattedyrcellers dna, når disse celler ikke er i S-fase. Optagelsen af $^{3}$H-TdR kan måles ved autoradiografi eller væskescintillationstælling (LSC) af dna fra de eksponerede celler. Medmindre der anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, eksponeres dyrkede pattedyrceller for teststoffet med og uden et eksogen metabolisk aktiveringssystem. UDS-test kan også foretages i in vivo-systemer.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Forberedelser

Teststof samt kontrol- og referencestoffer tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i egnede vehikler og tilsættes derefter kulturmediet inden testen. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed.

Der kan anvendes primærkulturer af rottehepatocytter, humane lymfocytter eller etablerede cellelinjer (f.eks. humane diploide fibroblaster).

Cellerne eksponeres for teststoffet med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

Forsøgsbetingelser

Antal kulturer

Ved autoradiografisk påvisning af UDS anvendes mindst to og ved LSC seks kulturer (eller mindre hvis det er videnskabeligt begrundet) for hvert eksperimentelt punkt.

▼B

Negative og positive kontroller

Der foretages sideløbende både positiv og negativ (ubehandlet og/eller vehikel) kontrol med og uden metabolisk aktivering i hvert forsøg.

Som positiv kontrol ved anvendelse af rottehepatocytter kan f.eks. benyttes 7,12-DMBA (7,12-dimetylbenzanthracen) eller 2-AAF (2-acetylaminofluoren). Som positiv kontrol ved anvendelse af etablerede cellelinjer kan f.eks. benyttes 4-NQO (4-nitroquinolin-N-oxid) både i forbindelse med autoradiografisk registrering og LSC uden metabolisk aktivering. Når der anvendes metaboliske aktiveringssystemer kan f.eks. N-dimetylnitrosamin benyttes til positiv kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet over et interval, som dækker alle påvirkninger. Den højeste koncentration bør have en vis cytotoksisk virkning. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

Celler

Der benyttes passende vækstmedier, $CO_2$-koncentration, temperatur og fugtighed til opretholdelse af kulturerne. Det undersøges regelmæssigt, om etablerede cellelinjer er kontamineret med mycoplasma.

Metabolisk aktivering

Der anvendes ikke metaboliske aktiveringssystemer i forbindelse med primærkulturer af hepatocytter. Etablerede cellelinjer og lymfocytter eksponeres for teststoffer både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem.

*Fremgangsmåde*

Forberedelse af kulturer

Etablerede cellelinjer fremstilles på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37 °C.

Primære rottehepatocytkulturer etableres, når hepatocytter umiddelbart efter isolering anbringes i et passende medium og får lov til at hæfte sig til den voksende overflade.

Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker.

▼B

Eksponering af kulturerne for teststoffet

*Primærkulturer af rottehepatocytter*

Rottehepatocytter eksponeres for teststoffet kort tid efter isolering i et passende tidsrum i et medium, som indeholder $^{3}$H-TdR. Efter eksponeringen fjernes cellerne fra mediet, hvorefter de vaskes, fikseres og tørres. Pladerne dyppes i en autoradiografisk emulsion (alternativt kan »stripping« -film anvendes) og eksponeres, fremkaldes, farves og tælles.

*Etablerede cellelinjer og lymfocytter*

*Autoradiografisk teknik:* Cellekulturerne eksponeres først for teststoffet i et passende tidsrum og derefter for $^{3}$H-TdR. Eksponeringsperioderne afhænger af stofferne, de metaboliske aktiveringssystemer og celletyperne. Eksponeringen for $^{3}$H-TdR bør enten foregå samtidig med eksponeringen for teststoffet eller få minutter efter, således at UDS måles på det tidspunkt, hvor aktiviteten er størst. Valget mellem de to fremgangsmåder afhænger af risikoen for interaktion mellem teststoffet og $^{3}$H-TdR. Det er muligt at skelne mellem UDS og semi-konservativ dna replication, idet den sidstnævnte proces inhiberes ved anvendelse af f.eks. argininfattige medier, et lavt serumindhold eller tilsætning af hydroxyurinstof til kulturmediet.

*LSC-måling af UDS:* Inden eksponering for teststoffet blokeres cellernes overgang til S-fasen som tidligere beskrevet. Derefter eksponeres cellerne på samme måde som ved den autoradiografiske teknik. Umiddelbart efter inkubationen ekstraheres cellernes dna og det totale dna-indhold samt mængden af inkorporeret $^{3}$H-TdR måles.

Når de nævnte teknikker anvendes på humane lymfocytter, er det unødvendigt at hæmme den semi-konservative dna replication, med mindre der er tale om stimulerede kulturer.

*Analyse*

*Autoradiografisk måling*

Ved måling af UDS i dyrkede celler medregnes kerner i S-fasen ikke. Der tælles mindst 50 celler pr. koncentration. Objektglassene kodes før tællingen. På hvert glas tælles en række forskellige tilfældigt valgte områder med stor indbyrdes afstand. Mængden af inkorporeret $^{3}$H-TdR i cytoplasmaet bestemmes ved tælling i tre områder på størrelse med kernen i hver optalt celles cytoplasma.

LSC-måling

Ved LSC-måling af UDS anvendes et passende antal kulturer pr. koncentration og pr. kontrolforsøg.

▼B

Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform.

2.1. AUTORADIOGRAFISK MÅLING

Mængden af inkorporeret $^{3}$H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn, som registreres i cellekerneområdet, anføres separat.

Fordelingen af mængden af inkorporeret $^{3}$H-TdR i cytoplasmaet og antallet af korn pr. kerne kan beskrives ved hjælp af middel, median og modus.

2.2. LSC-MÅLING

Ved LSC-måling angives $^{3}$H-TdR indlejringen som dpm/μg dna. Indlejringsfordelingen kan beskrives ved hjælp af middel dpm/μg dna med tilhørende standardafgivelse.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, tæthed og antal passager på eksponeringstidspunktet, antal cellekulturer

— metoder til opretholdelse af cellekulturer, herunder medium, temperatur og $CO_2$-koncentration

— teststof, vehikel, koncentrationer og begrundelse for valget af de anvendte koncentrationer

— detaljerede oplysninger om de metaboliske aktiveringssystemer

— eksponeringsplan

— positiv og negativ kontrol

— den anvendte autoradiografiske teknik

— fremgangsmåde ved blokering af cellernes overgang til S-fasen

— fremgangsmåde ved ekstration af dna og bestemmelse af det totale dna-indhold ved LSC-målingen

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

▼B

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.19. **SØSTERKROMATID OMBYTNING (SCE) IN VITRO**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Søsterkromatid ombytning (SCE) test er en korttidstest, som anvendes til påvisning af reciprok udveksling af DNA mellem de to søsterkromatider i et kromosom under replikation. Ved SCE sker der en udveksling af dna replikationsprodukter ved tilsyneladende homologe loci. Udvekslingsprocessen bygger antageligt på brud og genforening af dna-kæder, men dens molekylære grundlag er næsten ukendt. For at kunne påvise SCE er det nødvendigt at differentialmærke søsterkromatiderne, hvilket kan gøres ved at inkorporere bromdeoxyuridin (BrdU) i kromosomernes dna gennem to cellecykler.

Pattedyrceller eksponeres in vitro for teststoffet med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr, hvis dette skønnes relevant, og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indholder BrdU. Cellerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) med henblik på at akkumulere celler på et metafaselignende trin i mitosen (c-metafase), hvorefter de høstes og præpareres til kromosomanalyse.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

— Der kan anvendes primærkulturer (humane lymfocytter) eller etablerede cellelinjer (f.eks. Chinese Hamster Ovary celler). Ved anvendelse af cellelinjer bør det undersøges, om kulturen er kontamineret med mycoplasma.

— Der anvendes egnede kulturmedier og inkubationsbetingelser (temperatur, dyrkningsskåle, $CO_2$-koncentration og fugtighed).

— Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede koncentration af vehikel i testkulturen bør ikke påvirke cellernes levedygtighed eller vækstrate og en mulig påvirkning af SCE-frekvensen kontrolleres ved dyrkning af en kontrolkultur i opløsningsmidlet.

▼B

— Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celletyper med endogen metabolisk aktivering, bør aktiveringsform og -hastighed være egnet til den kemiske stofklasse, der testes.

*Forsøgsbetingelser*

Antal kulturer

Der anvendes mindst to parallelle kulturer for hvert eksperimentelt punkt.

Positiv og negativ kontrol

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages vehikelkontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelse:

  — ætylmetansulfonat

— indirekte virkende forbindelse:

  — cyclofosfamid.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en kemisk forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes mindst tre koncentrationer af teststoffet med passende intervaller mellem koncentrationerne. Den højeste koncentration bør have en tydelig toksisk virkning, men den må ikke forhindre den nødvendige celledeling. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

*Fremgangsmåde*

Dyrkning

Cellelinjer etableres på basis af stamkulturer (f.eks. ved trypsinering eller afrystning) og udsås med passende tæthed i dyrkningsskåle, hvorefter de inkuberes ved 37 °C. Når der er tale om monolagskulturer, justeres antallet af celler pr. kulturskål, således at kulturerne på høsttidspunktet højst dækker 50 % af vækstarealet. Cellerne kan også dyrkes i suspension. Humane lymfocytkulturer dyrkes under anvendelse af dertil egnede teknikker på basis af heparineret blod og inkuberes ved 37 °C.

▼B

Eksponering

Celler i eksponentiel vækstfase eksponeres for teststoffet i et passende tidsrum. Som oftest vil en eller to timer være tilstrækkeligt, men i nogle tilfælde kan eksponeringsperioden udvides til at dække to fulde cellecykler. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, eksponeres både med og uden tilsætning af et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof og dyrkes gennem to cellecykler i et medium, som indeholder BrdU. Alternativt kan cellerne eksponeres for teststoffet og BrdU samtidigt gennem en periode svarende til to cellecykler.

Humane lymfocytter eksponeres, mens de befinder sig i semisynkron tilstand.

Cellerne analyseres under deres anden deling efter eksponeringen, hvilket sikrer, at eksponeringsperioden dækker størstedelen af de følsomme faser i cellecyclus. Alle kulturer, som er tilsat BrdU, opbevares og manipuleres i mørke eller svagt lys fra glødelamper frem til cellerne høstes for at minimere fotolysen af dna, som indeholder BrdU.

Høst af celler

Cellekulturerne behandles med en tentrådsinhibitor (f.eks. colchicin) en til fire timer, før de høstes. Høst og kromosompræparering foregår særskilt for hver enkelt kultur.

Kromosompræparering og farvning

Ved kromosompræpareringen anvendes cytogenetiske standardteknikker. Farvning på objektglas med henblik på at påvise SCE kan foretages på en række forskellige måder (f.eks. fluorescens plus Giemsafarvning).

Analyse

Antallet af celler, som underkastes analyse, baseres på den spontane SCE-frekvens i kontrolforsøg. Normalt undersøges mindst 25 velpræparerede metafaser pr. kultur for SCE. Objektglassene kodes før analysen. Ved analyse af humane lymfocytter medtages kun metafaser med 46 centromerer. Ved analyse af etablerede cellelinjer medtages kun metafaser med det modale antal centromerer ± 2. Det anføres, hvorvidt ombytning i mærkningen omkring centromeret betragtes som SCE. Resultaterne efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform. Antal SCE pr. metafase og antal SCE pr. kromosom anføres separat for alle eksponerede kulturer og kontrolkulturer.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte celler, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: mediernes sammensætning, $CO_2$-koncentration, teststofkoncentration, det anvendte vehikel, inkubationstemperatur, eksponeringsperiode, den anvendte tentrådsinhibitor plus oplysninger om koncentration og behandlingens varighed, det anvendte metaboliske aktiveringssystem, positiv og negativ kontrol

— antal cellekulturer pr. eksperimentelt punkt

— detaljerede oplysninger om objektpræpareringsteknikken

— antal analyserede metafaser (separate oplysninger for hver enkelt kultur)

— gennemsnitligt antal SCE pr. celle og pr. kromosom (data angives separat for hver kultur)

— SCE-registreringskriterier

— begrundelse for valget af doser

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.20. **KØNSBUNDET RECESSIV LETAL TEST — DROSOPHILA MELANOGASTER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Ved kønsbundet recessiv letal test (SLRL) under anvendelse af Drosophila melanogaster undersøges forekomsten af både punktmutationer og mindre tabsmutationer hos insektets afkom. Der er tale om en fremadmutationstest, hvorved det er muligt at screene ca. 800 loci på X-kromosomet med henblik på registrering af mutationer. Dette antal udgør ca. 80 % af alle X-kromosomets loci. X-kromosomet udgør omkring en femtedel af den samlede haploide kromosommængde.

Mutationer i Drosophila melanogasters X-kromosom kommer fænotypisk til udtryk hos hanner, som er bærere af det muterede gen. Når mutationen under hemizygote betingelser er letal, konstateres dette som fravær af en af de to typer hanner, der normalt findes i en heterozygot huns afkom. I SLRL-testen udnyttes dette forhold ved hjælp af specielt arrangerede kromosomer med særlige markører.

1.5 KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

S t a m m e r

Der kan anvendes hanner af veldefinerede vildtypestammer og hunner fra Muller-5-stammen. Hunner fra andre stammer med passende mærkning og multipelt inverterede X-kromosomer kan også anvendes.

T e s t s t o f

Teststoffet opløses i vand. Stoffer, som er uopløselige i vand, kan opløses eller suspenderes i egnede bærestoffer (f.eks, en blanding af ætanol og Tween-60 eller -80) og derefter fortyndes i vand eller saltvand inden indgift. Dimetylsulfoxid bør ikke benyttes som bærestof.

▼B

Antal

Testen udformes således, at testfølsomhed og -specificitet er fastlagt på forhånd. Den spontane mutationsfrekvens, som registreres i kontrolforsøg, vil være af stor betydning for antallet af eksponerede kromosomer, der skal analyseres.

Administrationsmåde

Eksponeringen kan foregå ved oral indgivelse, injektion eller ved udsættelse for gasser eller dampe. Teststoffet kan eventuelt indgives i en sukkeropløsning. Om nødvendigt kan det opløses i en 0,7 % NaCl-opløsning og injiceres i thorax eller abdomen.

Negative og positive kontroller

Der foretages negativ (vehikel) og positiv kontrol. Hvis der foreligger egnede historiske kontroldata fra laboratorieforsøg, er det imidlertid ikke nødvendigt at foretage sideløbende kontrol.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes tre eksponeringskoncentrationer. Til en foreløbig vurdering kan anvendes en enkelt koncentration, som enten kan være den højeste koncentration, insekterne kan tåle, eller en koncentration, som forårsager nogen grad af toksisk virkning. Ved ikketoksiske stoffer eksponeres for de størst mulige koncentrationer.

Fremgangsmåde

Vildtypehanner (tre til fem dage gamle) eksponeres for teststoffet og parres enkeltvis med flere jomfruelige hunner fra Muller-5-stammen eller fra andre stammer med passende markører (multipelt inverterede X-kromosomer). Hunnerne udskiftes med nye jomfruelige hunner hver anden eller hver tredje dag, indtil hele kønscellecyklus er dækket. Hunnernes afkom registreres med henblik på konstatering af letale effekter, som svarer til eksponeringens virkning på henholdsvis modne sædceller, spermatider i sene stadier eller middelstadier, spermatider i tidlige stadier, spermatocytter og spermatogonier.

Heterozygote $F_1$-hunner fra de ovennævnte krydsninger parres individuelt (dvs. en hun pr. glas) med deres brødre. I $F_2$-generationen registreres hver bestand med henblik på konstatering af fravær af vildtypehanner. Hvis en bestand er afkom af en $F_1$-hun, som synes at bære et letalt gen i det parentale X-kromosom (dvs. der optræder ingen hanner med det eksponerede kromosom), testes døtre af denne hun med samme genotype med henblik på konstatering af, om den letale effekt gentages i næste generation.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform. Antal testede X-kromosomer, antal ufrugtbare hanner og antal letale kromosomer anføres for hver eksponeringskoncentration og for hver enkelt af de eksponerede hanners parringsperioder. Ligeledes anføres antal klynger af forskellig størrelse pr. han. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

▼B

Evalueringen af kønsbunden recessiv letal test baseres på passende statistiske metoder. I tilfælde af ophobning af generationer med recessive letale gener, som stammer fra en enkelt han, registreres disse og evalueres på et passende statistisk grundlag.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stammer: de anvendte Drosophila-stammer, insekternes alder, antal eksponerede hanner, antal sterile hanner, antal etablerede $F_2$-bestande, antal $F_2$-bestande uden afkom, antal kromosomer med letale gener på hvert kønscellestadium

— kriterier for fastlæggelse af størrelsen af de eksponerede grupper

— forsøgsbetingelser: detaljeret beskrivelse af eksponerings- og stikprøvetagningsplan, eksponeringskoncentrationer, toksicitetsdata, negativ (opløsningsmiddel) og positiv kontrol, såfremt der foretages kontrol

— kriterier for registrering af letale mutationer

— om muligt dosis-responsforhold

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.21. **CELLETRANSFORMATIONSTEST — PATTEDYRCELLER IN VITRO**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIPPER FOR TESTMETODEN

Kulturer af pattedyrceller kan anvendes til påvisning in vitro af fænotypiske forandringer, som induceres af kemiske forbindelser, der forbindes med maligne transformationer in vivo. Hyppigt anvendte celletyper er C3H10T$^{1/2}$, 3T3, SHE, Fischer-rotte, og testene bygger på forandringer i cellemorfologien, vækstevnen eller forankringsevnen i blød agar. Der findes også mindre hyppigt anvendte systemer, som bruges til undersøgelse af andre fysiologiske eller morfologiske forandringer i celler som følge af eksponering for karcinogene kemiske forbindelser. Der er ikke beskrevet nogen direkte virkningsmekanistisk forbindelse mellem cancer og de genetiske endpoints, der anvendes i disse in vitro test. Nogle af testsystemerne kan anvendes til påvisning af tumorpromotorer. Den cytotoksiske effekt kan bestemmes ved måling af teststoffets påvirkning af evnen til at danne kolonier (kloningsstyrken) eller af kulturernes vækstrater. Formålet med at måle den cytotoksiske effekt er at konstatere, om eksponeringen for teststoffet er toksikologisk relevant, men kan ikke benyttes til beregning af transformationsfrekvensen i alle test, eftersom nogle kræver lang inkubationstid og/eller overførsel til nye plader.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Celler

Der kan anvendes en række forskellige cellelinjer eller primærceller, afhængigt af hvilken transformationstest der foretages. Forsøgslederen må sikre, at de anvendte celler undergår relevante fænotypiske forandringer efter eksponering for kendte karcinogener, og forsøgslederens eget laboratorium må have påvist og dokumenteret den anvendte tests validitet og pålidelighed.

Medium

Der anvendes medier og forsøgsbetingelser i overensstemmelse med den anvendte transformationstest.

▼B

Teststof

Teststoffet tilsættes kulturmediet eller opløses eller suspenderes i et egnet vehikel, inden cellerne eksponeres. Den derved opnåede vehikelkoncentration bør ikke påvirke cellernes levedygtighed, vækstrate eller transformationsfrekvens.

Metabolisk aktivering

Cellerne eksponeres for teststoffet både med og uden et eksogent metabolisk aktiveringssystem fra pattedyr. Når der benyttes celler med endogen metabolisk aktivering, bør det være påvist, at aktiveringsformen egner sig til den form for kemisk forbindelse, der testes.

*Forsøgsbetingelser*

Positive og negative kontroller

Som positiv kontrol anvendes i hvert enkelt forsøg både en direkte virkende kemisk forbindelse og en forbindelse, som kræver metabolisk aktivering. Desuden foretages negativ (vehikel) kontrol.

Følgende kemiske forbindelser kan f.eks. anvendes til positiv kontrol:

— direkte virkende forbindelser:

  — etylmetansulfonat

  — β-propiolacton

— forbindelser som kræver metabolisk aktivering:

  — 2-acetylaminofluoren

  — 4-dimetylaminoazobenzen

  — 7,12-dimetylbenzanthracen.

Når det skønnes relevant, bør der foretages supplerende positiv kontrol med anvendelse af en forbindelse af samme kemiske stofklasse som teststoffet.

Eksponeringskoncentrationer

Der anvendes en række forskellige koncentrationer af teststoffet, således at der frembringes koncentrationsafhængige toksiske virkninger. Den højeste koncentration bør medføre en lav overlevelsesgrad, og overlevelsesgraden ved den laveste koncentration bør være af samme størrelsesorden som ved det negative kontrolforsøg. Stoffer, som er relativt uopløselige i vand, testes under anvendelse af passende fremgangsmåder op til opløselighedsgrænsen. Den højeste koncentration af ikke-toksiske teststoffer, som er frit opløselige i vand, fastlægges fra test til test.

▼B

*Fremgangsmåde*

Cellerne eksponeres i en passende periode afhængig af det anvendte testsystem. Dette kan indebære gentagne doseringer med udskiftning af medium (og om nødvendigt ny metabolisk aktivering), hvis der er tale om langvarig eksponering. Celler, hvis endogene metaboliske aktivering er utilstrækkelig, testes både med og uden et passende metabolisk aktiveringssystem. Efter eksponeringen vaskes cellerne frie for teststof, hvorefter de dyrkes med henblik på at lade den transformerede fænotype, testen bygger på, komme til udtryk og med henblik på bestemmelse af transformationsfrekvensen. Alle resultater efterprøves i et uafhængigt forsøg.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform og kan foreligge i forskellige former afhængigt af den anvendte test. Der kan f.eks. være tale om optælling på plader, registrering af positive plader eller antal transformerede celler. Når det er relevant, udtrykkes overlevelsesgraden som en procentdel af overlevelsen i kontrolforsøgene, og transformationsfrekvensen udtrykkes som antal transformerede celler pr. overlevende. Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— den anvendte celletype, antal cellekulturer, metoder til opretholdelse af cellekulturer

— forsøgsbetingelser: teststofkoncentration, anvendt vehikel, inkubationstemperatur, inkubationstid, eksponeringens varighed og frekvens, celletæthed under eksponeringen, det anvendte eksogene metaboliske aktiveringssystem, positive og negative kontroller, specifikation af den fænotype testen bygger på, det anvendte selektive system (hvis et sådant er anvendt), begrundelse for valget af doser

— metoder til registrering af levedygtige og transformerede celler

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.22. **DOMINANT LETAL TEST — GNAVER**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Dominante letale virkninger forårsager, at fostret dør. Nå der ved eksponering for kemiske forbindelser induceres dominante letale mutationer, er dette et tegn pi, at forsøgsdyreartens kønscellevæv er blevet afficeret. Der er bred enighed om, at dominante letale gener opstår på grund af kromosomskader (strukturelle og numeriske anomalier). Hvis eksponerede hunners afkom dør på det embryonale stade, kan dette også skyldes toksiske virkninger.

Normalt eksponeres hanner for teststoffet, hvorefter de parres med ueksponerede jomfruelige hunner. Kønscellernes forskellige stadier kan undersøges separat ved anvendelse af på hinanden følgende parringsperioder. Forøgelsen af antallet af døde implantater pr. hun i den eksponerede gruppe i forhold til antallet af døde implantater pr. hun i kontrolgruppen er udtryk for den letale virkning efter implantation. Den letale virkning før implantation kan vurderes på grundlag af optælling af corpora lutea eller ved sammenligning af det totale antal implantater pr. hun i de eksponerede grupper og kontrolgruppen. Den totale dominante letale virkning er summen af de letale virkninger før og efter implantation. Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Fald i antallet af implantater i bestemte tidsperioder kan skyldes celledrab (af spermatocytter og/eller spermatogonier).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Hvis det er muligt, opløses eller suspenderes teststoffet i fysiologisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Det anvendte vehikel bør ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning. Testopløsningen anvendes umiddelbart efter fremstillingen.

▼B

*Forsøgsbetingelser*

Administrationsmåde

Normalt gives hele dosis på en gang. Der kan også anvendes dosering ad flere gange, når der er toksikologisk begrundelse herfor. Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Der kan også benyttes andre former for indgift.

Forsøgsdyr

Rotter eller mus anbefales som forsøgsdyr. Sunde og fuldt kønsmodne dyr fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper.

Antal og køn

Der anvendes et passende antal hanner under hensyntagen til den spontane variation i den biologiske egenskab, der danner grundlag for testen. Det valgte antal baseres på den på forhånd fastlagte testfølsomhed og signifikansstyrke. I et typisk forsøg vil antallet af hanner være tilstrækkeligt til, at mellem 30 og 50 hunner bliver drægtige i hver parringsperiode.

Negative og positive kontroller

Normalt foretages sideløbende positiv og negativ (vehikel) kontrol i hvert forsøg. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium, kan disse dog anvendes i stedet for sideløbende positiv kontrol. Positive kontrolstoffer anvendes i tilstrækkeligt lave doser (f.eks. MMS, i.p., 10 mg/kg) til at vise testens følsomhed.

Dosisniveauer

Der anvendes normalt tre forskellige dosisniveauer. Den største dosis bør forårsage tegn på toksisk virkning eller nedsætte de eksponerede dyrs fertilitet. I nogle tilfælde vil et enkelt højt dosisniveau være tilstrækkeligt.

Grænsetest

Når der er tale om ikke-toksiske stoffer, testes en enkeltdosis på 5 g/kg eller gentagen indgift af 1 g/kg/dag.

*Fremgangsmåde*

Der kan anvendes flere forskellige doseringsskemaer. Normalt gives hele dosis på en gang, men andre skemaer lader sig også anvende.

Hannerne parres efter doseringen individuelt med en eller to ikkedoserede jomfruelige hunner i på hinanden følgende perioder af passende længde. Hunnerne placeres hos hannerne i en periode svarende til mindst en ægcyklus, eller indtil parringen har fundet sted, hvilket konstateres ved tilstedeværelse af sperma i vagina eller en vaginalprop.

▼B

Antallet af parringer efter doseringen fastlægges på grundlag af doseringsskemaet, som skal sikre, at alle kønscellestadier er repræsenteret efter doseringen.

Hunner aflives i anden halvdel af drægtighedsperioden, og uterus' indhold undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af levende og døde implantater. Ovarierne undersøges med henblik på bestemmelse af antallet af corpora lutea.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform med angivelse af antal hanner samt antal drægtige og ikke drægtige hunner. Resultaterne af hver enkelt parring, herunder identificering af hver enkelt han og hun anføres individuelt. For hver hun anføres parringsuge, hannens dosis og antallet af levende og døde implantater.

Beregningen af den totale dominante letale virkning baseres på sammenligning af antallet af levende implantater pr. hun i forsøgsgruppen og antallet af levende implantater pr. hun i kontrolgruppen. Forholdet mellem døde og levende implantater i forsøgsgruppen sammenlignes med forholdet i kontrolgruppen med henblik på bestemmelse af den letale virkning efter implantation.

Hvis data registreres som tidlige og sene dødsfald, skal dette fremgå af tabellerne. Hvis der foretages vurdering af den letale virkning før implantation, anføres denne. Den letale virkning før implantation kan beregnes som forskellen mellem antallet af corpora lutea og antallet af implantater eller som et lavere gennemsnitligt antal implantationer pr. uterus i forhold til kontrolparringerne.

Evalueringen af data baseres på passende statistiske metoder.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, de anvendte dyrs alder og vægt, antal dyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupperne

— teststof, bærestof, de anvendte dosisniveauer og begrundelse for valget af disse, negativ og positiv kontrol, toksicitetsdata

— administrationsmåde og doseringens varighed

— parringsskema

— metode til konstatering af, om parring har fundet sted

— aflivningstidspunkt

— kriterier for registrering af dominante letale gener

— om muligt dosis-responsforhold

▼B

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

## B.23. TEST FOR KROMOSOMABERRATIONER I SPERMATOGONIER HOS PATTEDYR

### 1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 48 3 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

### 1.1. INDLEDNING

Formålet med in vivo-testen for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr er et påvise, om et stof forårsager strukturelle kromosomafvigelser i spermatogonier fra pattedyr (1) (2) (3) (4) (5). Der er to typer strukturændringer, kromosomtypen og kromatidtypen. De fleste kemiske mutagener forårsager ændringer af kromatidtypen, men også ændringer af kromosomtypen forekommer. Den foreliggende metode er ikke beregnet til at påvise antalsafvigelser og benyttes ikke rutinemæssigt til det formål. Kromosommutationer og lignende er årsag til mange genetiske sygdomme hos mennesker.

Ved denne test måles kromosomhændelser i spermatogonier, og den forventes derfor at kunne forudsige induktion af arvelige mutationer i kimceller.

Der benyttes rutinemæssigt gnavere i denne test. Ved denne cytogenetiske in vivo-test påvises kromosomaberrationer ved spermatogoniers mitose. Metoden omfatter ikke andre målceller.

For at påvise aberrationer af kromatidtypen i spermatogonier må den første mitotiske celledeling efter behandlingen undersøges, inden eventuelle skader går tabt ved efterfølgende celledelinger. Der kan indhentes yderligere information fra behandlede spermatogonstamceller ved meiotisk kromosomanalyse for aberrationer af kromosomtypen ved diakinese-metafase I, når de behandlede celler bliver til spermatocytter.

Denne in vivo-test er tilrettelagt til at vise, om stoffer, der er mutagene over for somatiske celler, også er aktive i kimceller. Derudover er spermatogontesten relevant for en vurdering af den reelle mutagenicitetsfare, idet der tages hensyn til sådanne faktorer som in vivo-metabolisme, farmakokinetik og dna-reparationsprocesser.

I testiklerne er der flere generationer af spermatogonier til stede, som udviser forskellig følsomhed over for kemisk behandling. På denne måde repræsenterer de påviste aberrationer den samlede reaktion fra behandlede spermatogonpopulationer, hvor resultatet domineres af de mere talrige differentierede spermatogonier. Forskellige generationer af spermatogonier er, alt efter deres placering i testiklerne, i varierende grad i berøring med det almindelige kredsløb på grund af den fysiske og fysiologiske Sertoli-cellebarriere og blod-testikelbarrieren.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet eller en reaktiv metabolit ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Se også den generelle indledning til del B.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Aberration af kromatidtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på enkeltkromatider eller brud på og sammenføjning af kromatider.

**Aberration af kromosomtypen:** beskadigelse af kromosomstrukturen i form af brud på — eller brud på og sammenføjning af — begge kromatider på samme sted.

**Gap:** en kromatisk beskadigelse, som er mindre end ét kromatid bred, og hvor misalignment af kromatiderne er minimal.

**Antalsafvigelse:** ændring i kromosomtallet i forhold til det for de pågældende dyr normale antal.

**Polyploidi:** et multiplum af det haploide kromosomtal (n), som ikke er det diploide tal (dvs. 3n, 4n osv.).

**Strukturel ændring:** ændring i kromosomstrukturen, som kan iagttages ved mikroskopi i celledelingens metafase i form af deletioner, intrachange og interchange.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Dyrene udsættes for teststoffet på passende måde og aflives efter passende tidsrum efter eksponeringen. Inden aflivningen behandles dyrene med et metafasestandsende stof (f.eks. colchicin eller Colcemid®). Der fremstilles derefter præparater af kimceller, som farves, og metafasecellerne undersøges for kromosomaberrationer.

1.4. BESKRIVELSE AE TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis hanmus og -hamstere, selv om hanner af andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til del B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne handyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt. Dyrene tilvænnes laboratorieforholdene i mindst fem dage.

▼B

1.4.1.4. *Fremstilling af doser*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I alle forsøg medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolprøver skal frembringe strukturelle ændringer i spermatogonier in vivo ved en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne.

Der vælges sådanne doser i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet, og at der kun foretages én prøveudtagning. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede stoffer. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

| Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|
| Cyclophosphamid<br>Cyclophosphamidmonohydrat | 50-18-0<br>6055-19-2 | 200-015-4 |
| Cyclohexylamin | 108-91-8 | 203-629-0 |
| Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| Monomer acrylamid | 79-06-1 | 201-173-7 |
| Triethylenmelamin | 51-18-3 | 200-083-5 |

Der skal ved hver prøveudtagning indgå negative kontroldyr, som kun er behandlet med opløsningsmiddel eller bærestof og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, medmindre tidligere kontroldata har vist en acceptabel variation mellem dyr indbyrdes og acceptabel hyppighed af celler med kromosomafvigelser. Desuden skal der være ubehandlede kontrolgrupper, medmindre der foreligger tidligere opnåede eller offentliggjorte kontroldata, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ingen skadelige eller mutagene virkninger har.

▼B

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal**

Hver behandlet gruppe og kontrolgruppe skal bestå af mindst fem analyserbare handyr.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives fortrinsvis ad én eller to gange (dvs. som én behandling eller to behandlinger). De kan også indgives i to deldoser, dvs. to behandlinger samme dag med kun nogle få timers interval, hvorved det bliver lettere at indgive et større materialevolumen. Indgift på anden måde skal begrundes sagligt.

I gruppen med højeste dosis udtages der prøver på to tidspunkter efter behandling. Da teststoffet kan indvirke på cellecyklussens kinetik, udtages der er tidlig og en sen prøve, nemlig ca. 24 timer og ca. 48 timer efter behandlingen. For alle andre doser end den højeste dosis udtages en prøve 24 timer eller 1,5 gange cellecyklus efter behandlingen, medmindre et andet prøveudtagningstidspunkt vides at være bedre egnet til påvisning af virkninger (6).

Der kan desuden udtages prøver på andre tidspunkter. For kemikalier, der kan fremkalde kromosom-lagging eller have S-uafhængige virkninger, kan tidligere prøveudtagning være hensigtsmæssigt (1).

Det vurderes i det enkelte tilfælde, om en behandlingsplan med gentagen indgift er velegnet. Ved behandling med gentagen indgift aflives dyrene 24 timer (1,5 cellecykluslængde) efter sidste behandling. Der kan udtages yderligere prøver, hvis det er hensigtsmæssigt.

Inden aflivningen gives dyrene en intraperitoneal injektion med en passende dosis metafasestandsende stof (f.eks. Colcemid® eller colchicin). Der udtages prøver af forsøgsdyr efter et passende tidsrum. For mus er dette tidsrum ca. tre-fem timer, for hamster ca. fire-fem timer.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen (7). Er der tale om toksicitet, benyttes der tre dosisniveauer for første prøveudtagningstidspunkt. Disse dosisniveauer skal dække et interval fra maksimal toksicitet til næsten ingen eller ingen toksicitet. Ved den efterfølgende prøveudtagning behøves kun den højeste dosis benyttet. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død.

▼B

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i spermatogonier (f.eks. et lavere forhold mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafaser: faldet må ikke være større end 50 %).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet ved én eller i to behandlinger på samme dag, ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturnæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, kan en fuldstændig undersøgelse med tre dosisniveauer anses for unødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle eller ved intraperitoneal injektion. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. **Præparering af kromosomer**

Umiddelbart efter aflivningen udtages der celleopslæmninger fra en eller begge testikler, som udsættes for hyptonisk væske og fikseres. Derefter stryges cellerne ud på objektglas og farves.

1.5.7. **Analyse**

For hvert dyr bør mindst 100 godt fordelte metafaseceller analyseres (dvs. mindst 500 metafaseceller pr. gruppe). Dette antal kan sættes ned, hvis der iagttages et stort antal aberrationer. Alle objektglas, herunder positive og negative kontrolprøver, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Da fikseringen ofte medfører, at en del af metafasecellerne går i stykker, og kromosomerne går tabt, bør bedømte celler indeholde et antal centromerer svarende til kromosomtallet 2n ± 2.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data for de enkelte dyr præsenteres i tabelform. Forsøgsenheden er et dyr. For hvert dyr registreres antallet af celler med strukturelle kromosomaberrationer, og antallet af kromosomaberrationer pr. celle bedømmes. Forskellige typer strukturelle kromosomaberrationer skal anføres med antal og hyppighed for behandlingsgrupper og kontrolgrupper. Gaps registreres særskilt og oplyses, men medregnes ikke generelt i den totale aberrationshyppighed.

▼B

Hvis der iagttages såvel mitose som meiose, bestemmes forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase som et mål for cytotoksiciteten for alle behandlede dyr og negative kontroldyr i en samlet prøve på 100 celler under deling for hvert dyr. Hvis der kun iagttages mitose, bestemmes mitoseindekset i mindst 1 000 celler for hvert dyr.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Der findes en række kriterier for at afgøre, om et resultat er positivt, f.eks. en dosisafhængig forøgelse af andelen af celler med kromosomaberrationer eller en tydelig forøgelse af antallet af celler med aberrationer hos en enkeltdosisgruppe på et bestemt prøveudtagningstidspunkt. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (8). Statistisk signifikans bør ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt. Tvetydige resultater bør afklares ved yderligere test, helst med ændring af forsøgsbetingelserne.

Et teststof, der ikke opfylder ovennævnte kriterier, anses ikke for mutagent i dette system.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en in vivo-test for kromosomaberrationer i spermatogonier hos pattedyr viser, at teststoffet fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder strukturelle kromosomaberrationer i kimceller hos den undersøgte art.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet, bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

*TESTRAPPORT*

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr og deres alder

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

▼B

Testbetingelser:

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— begrundelse for indgiftsvej

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for aflivningstidspunkter

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr. dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— det metafasestandsende stofs betegnelse og koncentration og behandlingens varighed

— metoder til præparering af objektglas

— kriterier for bedømmelse af aberrationer

— antal analyserede celler pr. dyr

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— tegn på toksicitet

— mitoseindeks

— forholdet mellem spermatogonmitoser og første og anden meiosemetafase

— antal aberrationer og type, anført særskilt for hvert dyr

— samlet antal aberrationer pr. gruppe

— antal celler med aberrationer pr. gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— data for sideløbende negative kontrolprøver

— data for tidligere negative kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— data for sideløbende positive kontrolprøver

— eventuelt iagttagne ploidiændringer

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) Adler, I.D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel. C, Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(2) Adler. I.D. (1984), Cytogenic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, ed. S. Venitt and J.M. Parry, IRL. Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, Cytogenetics and Cell Genetics. 3. pp. 289-294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part 1 revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melboume, Sydney, pp. 115-141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res. 52. pp. 207-209.

(6) Adler, I.D., Shelby, M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T, and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary- Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, Mutation Res., 312, pp. 313-318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland D.J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis. 7, pp. 313-319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D.J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS SubCommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

▼B

B.24. **SPOTTEST — MUS**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIPPER FOR TESTMETODEN

Spottesten er en in vivo-test i mus, hvor musefostre på det embryonale stade eksponeres for kemiske forbindelser. Målcellerne i fostrene er melanoblasterne, og målgenerne er de gener, der bestemmer pelshårenes pigmentering. Fostrene er heterozygote i et antal af disse pelsfarvegener. Ved mutation eller tab af det dominante allel i en melanoblast ved en række genetiske hændelser kommer den recessive fænotype til udtryk i de celler, der dannes fra denne stamcelle, hvilket fører til anderledes farvede pletter i musens pels. Mængden af afkom med sådanne pletter, dvs. mutationer, registreres og sammenlignes med den tilsvarende mængde blandt afkom af hunmus, der kun har været eksponeret for opløsningsmidlet. Ved spottesten i mus konstateres formodede somatiske mutationer i fosterceller.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Teststoffet opløses eller suspenderes så vidt muligt i isotonisk saltvand. Kemiske forbindelser, som er uopløselige i vand, opløses eller suspenderes i passende vehikler. Det anvendte vehikel må ikke indvirke på teststoffet eller forårsage toksiske effekter. Fremstillingen af teststofpræparationen foretages umiddelbart inden anvendelsen.

F o r s ø g s d y r

Mus af stammen T-stock (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) parres med enten stammen HT-stock (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) eller C57 BL (nonagouti, a/a). Andre egnede krydsninger som NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) og DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) kan anvendes, under forudsætning af, at afkommet er nonagouti.

▼B

Antal og køn

Der anvendes et antal drægtige hunner, som er tilstrækkeligt stort til, at der produceres en passende mængde afkom for hver af de anvendte doser. Holdstørrelsen kan anslås på grundlag af antallet af observerede pletter hos de eksponerede mus og kontroldatas størrelsesorden. Et resultat kan først accepteres som negativt, hvis mindst 300 unger af hunner, som har været eksponeret for den største dosis, er undersøgt.

Positive og negative kontroller

Der foretages sideløbende kontrol med mus, som kun eksponeres for vehikel (negativ kontrol). Historiske kontroldata fra samme laboratorium kan, under forudsætning af at der er tale om homogene data, indregnes med henblik på at forøge testens sensitivitet. Der bør foreligge positive kontroldata fra nyligt foretagne forsøg i samme laboratorium med en kemisk forbindelse, som vides at være mutagen i denne test, i tilfælde af at der ikke konstateres nogen mutagen virkning af teststoffet.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion i de drægtige hunner. Inhalation og andre administrationsmåder kan anvendes, hvis de er hensigtsmæssige.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst to doseringer, hvoraf den ene skal medføre tegn på toksisk virkning eller reduceret kuldstørrelse. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

*Fremgangsmåde*

Normalt gives forsøgsdyrene hele dosis på en gang på drægtighedsperiodens dag 8, 9 eller 10, idet dag 1 er den dag, vaginalproppen observeres første gang. Disse dage svarer til 7,25, 8,25 og 9,25 dage efter befrugtningen. Gentagne doseringer kan foretages på disse dage.

Analyse

Afkommet blindkodes og eventuelle pigmenterede pletter registreres mellem tre og fire uger efter fødslen. Der skelnes mellem tre typer pletter:

a) hvide pletter inden for en afstand af 5 mm fra den ventrale midtlinje; disse pletter antages at være et resultat af celledrab (WMVS)

b) gule agouti-agtige pletter på eller omkring pattevorter, kønsåbninger, strube, axiller, lyske og midt i panden; disse pletter antages at være et resultat af fejldifferentiering (MDS)

c) pigmenterede og hvide pletter tilfældigt fordelt i pelsen; disse pletter antages at være et resultat af somatiske mutationer (RS).

▼B

Alle tre typer registreres, men kun den sidstnævnte, RS, et genetisk relevant. Hvis der er problemer med at skelne mellem MDS og RS, kan der benyttes fluorescensmikroskopi af hårprøver.

Synlige morfologiske abnormiteter hos afkommet registreres også.

2. **DATA**

Det samlede antal undersøgte unger og antal unger med en eller flere pletter, som antages at være et resultat af somatisk mutation, anføres. Data fra forsøgsgrupper og negativ kontrolgruppe sammenlignes ved hjælp af egnede statistiske metoder. Data anføres også pr. kuld.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORTEN

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— de anvendte stammer

— antal drægtige hunner i forsøgs- og kontrolgrupperne

— den gennemsnitlige kuldstørrelse i forsøgs- og kontrolgrupperne ved fødslen, og når ungerne er vænnet fra

— dosisniveauer

— opløsningsmiddel

— den dag i drægtighedsperioden, hvor doseringen finder sted

— administreringsform

— det samlede antal undersøgte unger og antal unger med WMVS, MDS og RS i forsøgs- og kontrolgrupperne

— makroskopiske morfologiske abnormiteter

— om muligt dosis-responsforhold for RS

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.25. **ARVELIG TRANSLOKATION HOS MUS**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Ved test af arvelig translokation hos mus konstateres strukturelle og numeriske kromosomforandringer i pattedyrskønsceller udtrykt i førstegenerations afkom. Kromosomforandringerne, der måles, er reciprokke translokationer, og, når afkommet også omfatter hundyr, tab af et X-kromosom. Bærere af translokationer og XO-hunner har nedsat fertilitet, hvilket udnyttes ved udvælgelsen af $F_1$-afkom med henblik på cytogenetisk analyse. Visse typer translokationer (X-autosome og c-t-typen) forårsager fuldstændig sterilitet. Translokationer konstateres cytogenetisk i meiosens diakinese-metafase I hos hanner, som enten kan være af $F_1$-generationen eller sønner af $F_1$-hunner. XO-hunner identificeres cytogenetisk ved, at kromosomtallet i knoglemarvmitoser kun er 39.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Teststoffet opløses i isotonisk saltvand. Uopløselige stoffer opløses eller suspenderes i egnede vehikler. Teststofopløsning anvendes umiddelbart efter fremstillingen. Hvis der anvendes et vehikel med henblik på at lette doseringen, må det ikke interferere med teststoffet eller have nogen toksisk virkning.

Administrationsmåde

Sædvanligvis indgives teststoffet ved oral intubering eller intraperitoneal injektion. Andre administrationsmåder kan være hensigtsmæssige.

Forsøgsdyr

Som forsøgsdyr benyttes mus, idet disse giver de letteste betingelser med hensyn til avl og cytologisk verifikation. Der kræves ikke nogen bestemt stamme. Hvis det påregnes at teste fertiliteten, bør den anvendte stammes gennemsnitlige kuldstørrelse være over otte og relativt konstant.

Der anvendes sunde kønsmodne dyr.

▼B

Antal dyr

Det nødvendige antal dyr afhænger af den spontane translokationsfrekvens og den induktionsfrekvens, som er nødvendig for at opnå et positivt resultat.

Normalt gennemføres testen ved undersøgelse af $F_1$-hanner. Der undersøges mindst 500 $F_1$-hanner pr. dosis. Hvis der tillige anvendes $F_1$-hunner, undersøges 300 af hvert køn.

Negative og positive kontroller

Adækvate kontroldata, stammende fra sideløbende og historiske kontrolforsøg, skal være tilgængelige. Når der foreligger acceptable positive kontrolresultater fra undersøgelser foretaget for nyligt i det samme laboratorium, kan disse anvendes i stedet for en sideløbende positiv kontrol.

Dosisniveauer

Der testes en dosis, normalt den største dosis med minimal toksisk virkning, men uden indflydelse på reproduktion eller overlevelse. Hvis dosis-responsforholdet skal bestemmes, anvendes yderligere to mindre doser. Ikke-toksiske stoffer testes under anvendelse af så store doser som praktisk muligt.

*Fremgangsmåde*

Eksponering og parring

Der kan anvendes to forskellige eksponeringsskemaer. I det hyppigst anvendte skema gives hele dosis på en gang. Teststoffet kan også gives syv dage om ugen i 35 dage. Antallet af parringer efter eksponeringen afhænger af eksponermgsskemaet og skal være stort nok til at sikre, at alle eksponerede kønscellestadier kan undersøges. Efter parringen placeres hunnerne i hver sit bur, Ved fødslen registreres dato, kuldstørrelse og afkommets køn. Alle hanner blandt afkommet vænnes fra og hunnerne frasorteres, medmindre de medtages i forsøget.

Test af heterozygoti efter translokation

Der anvendes en af to mulige metoder:

— fertilitetsundersøgelse af $F_1$-generationen med efterfølgende verifikation af mulige translokationsbærere ved hjælp af cytogenetisk analyse

— cytogenetisk analyse af alle $F_1$-hanner uden forudgående udvælgelse på grundlag af fertilitetsundersøgelser.

a) Fertilitetsundersøgelse

Nedsat fertilitet hos $F_1$-generationens medlemmer kan konstateres ved observation af kuldstørrelsen og/eller analyse af de parrede hundyrs uterusindhold.

Forinden fastlægges der kriterier for normal og nedsat fertilitet hos den anvendte stamme.

▼B

*Observation af kuldstørrelse:* De $F_1$-hanner, som skal undersøges, placeres i hver sit bur sammen med hunner fra samme forsøg eller fra bestanden. Fra og med 18 dage efter parringen iagttages burene dagligt. Kuldstørrelse og køn i $F_2$-generationen registreres ved fødslen, hvorefter kuldene fjernes. Hvis der testes $F_1$-hunner, bevares de små $F_2$-kuld med henblik på yderligere undersøgelser. Konstatering af, om hunner er translokationsbærere, forgår ved cytogenetisk analyse af translokation hos en vilkårlig han blandt deres afkom. XO-hunner identificeres gennem ændring af forholdet mellem hanner og hunner i deres afkom fra 1:1 til 1:2. Ved en sekventielt ordnet fremgangsmåde elimineres normale $F_1$-dyr fra den videre undersøgelse, hvis størreisen af det første $F_2$-kuld er lig med eller højere end en på forhånd fastsat normalværdi. I modsat fald observeres det andet eller tredje $F_2$-kuld.

$F_1$-dyr, der ikke kan klassificeres som normale efter observation af op til tre $F_2$-kuld underkastes enten yderligere undersøgelse ved analyse af de parrede hunners uterusindhold eller ved direkte cytogenetisk analyse.

*Analyse af uterusindholdet:* Den nedsatte kuldstørrelse hos translokationsbærere skyldes, at fostrene dør på det embryonale stade, så et stort antal døde implantater tyder på translokation hos forsøgsdyret. De $F_1$-hanner, som skal undersøges, parres hver især med to til tre hunner. Ved daglig undersøgelse mellem kl. 10 og 12 om formiddagen af forekomsten af vaginalprop, konstateres det, om befrugtning har fundet sted. Hunnerne aflives 14 til 16 dage senere, og antallet af levende og døde implantater i uteri registreres.

b) Cytogenetisk analyse

Der fremstilles testikelpræparater ved lufttørringsteknik. Translokationsbærere identificeres på grundlag af multivalente konfigurationer i primære spermatocytters diakinese-metafase I. Hvis der observeres mindst to celler med multivalente konfigurationer betragtes det som bevist, at forsøgsdyret er translokationsbærer.

Når der ikke gennemføres udvælgelse på basis af fertilitetsundersøgelser, undersøges alle $F_1$-hanner cytogenetisk. Der foretages mikroskopisk undersøgelse af mindst 25 diakinese-metafaser I pr. han. $F_1$-hanner med små testikler og defekt meiose, som standser før diakinesen, samt $F_1$-hunner, som formodes at være XO-bærere, underkastes undersøgelse af mitotiske metafaser i spermatogonier eller knoglemarv. Hvis der observeres usædvanlig lange og/eller korte kromosomer i ti celler, betragtes det som påvist, at der er tale om en translokation, som gør hanner sterile (c-t-typen). Visse X-autosome translokationer, som gør hanner sterile, kan kun identificeres ved båndanalyse af mitosekromosomer. Hvis der observeres 39 kromosomer i ti mitoser, betragtes det som påvist, at der er tale om en XO-hun.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse og kønsfordeling i forældregenerationens afkom ved fødslen og ved afvænningen angives for hver parringsperiode.

▼B

Med henblik på vurdering af $F_1$-dyrenes fertilitet anføres den gennemsnitlige kuldstørrelse efter de normale parringer og hver enkelt kuldstørrelse efter parring af $F_1$-translokationsbærere. Efter analyse af uterusindhold anføres det gennemsnitlige antal levende og døde implantater efter normale parringer og antallet af levende og døde implantater efter hver enkelt parring af $F_1$-translokationsbærere.

Efter cytogenetisk analyse af diakinese-metafaser I anføres antallet af multivalente konfigurationer og det totale antal undersøgte celler for hver enkelt translokationsbærer.

Det samlede antal parringer og parringsperiodernes længde anføres for sterile $F_1$-dyr. Der gives detaljerede oplysninger om testikelvægt og cytogenetisk analyse.

Den gennemsnitlige kuldstørrelse, $F_2$-afkommets kønsfordeling og resultaterne af den cytogenetiske analyse anføres for XO-hunner.

Hvis mulige $F_1$-translokationsbærere udvælges ved fertilitetsundersøgelser, skal tabellerne indeholde oplysninger om, hvor mange af de udvalgte dyr der senere viste sig at være heterozygote efter translokation.

Data fra negative og positive kontrolforsøg rapporteres på lignende måde.

## 3. RAPPORTERING

### 3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stamme, dyrenes alder, de doserede dyrs vægt

— antal af forældredyr af hvert køn i forsøgs- og kontrolgrupper

— forsøgsbetingelser, detaljeret beskrivelse af dyrenes behandling, dosisniveau, opløsningsmidler, parringsskema

— afkommets antal og køn for hver enkelt hun, antal og køn af afkom, som opdrættes med henblik på translokationsanalyse

— translokationsanalytiske kriterier og analysetidspunkt

— antal translokationsbærere samt detaljeret beskrivelse af disse, herunder avlingsdata og oplysninger om uterusindhold, hvis sådanne foreligger

— cytogenetisk fremgangsmåde og detaljerede oplysninger om den mikroskopiske analyse, helst vedlagt billeder

— statistisk evaluering

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

▼B

3.2. EVALUERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

## B.26. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ GNAVERE

### 1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksicitetstest svarer til OECD TG 408 (1998).

### 1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en længere periode, som dækker afvænning, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Metoden lægger yderligere vægt på virkninger på neurologiske områder og peger på virkninger på det immunologiske og reproduktive system. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget. Undersøgelsen skulle muliggøre identifikation af kemikalier med neurotoksiske virkninger og virkninger på det immunologiske og reproduktive system, som kan føre til yderligere dybdegående undersøgelser.

Se også den generelle indledning til del B.

### 1.2. DEFINITIONER

**Dosis:** Mængden af indgivet testkemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af testkemikalium i forhold til dyrets vægt (f.eks. mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

**Dosering**: Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

**NOAEL:** Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosisniveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

### 1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Testkemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret, og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene i mindst fem dage, og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer (kilde), køn, vægt og/eller alder. Dyrenes randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.2. **Fremstilling af doser**

Stoffet, der skal undersøges, indgives gennem sonde eller i føden eller drikkevandet. Måden at indgive på afhænger af undersøgelsens formål og testmaterialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor muligt anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (f.eks. majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.4.3. **Testomstændighederne**

1.4.3.1. *Forsøgsdyrene*

Den foretrukne art er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Almindeligt anvendte laboratoriestammer af unge, sunde, voksne dyr bør anvendes. Hundyrene skal ikke have haft unger og ikke være gravide. Indgiften bør begynde snarest efter fravænning, og i hvert fald før dyrene er ni uger gamle. Ved forsøgets begyndelse bør den indbyrdes vægtforskel være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnittet for hvert køn. Når forsøget foretages som forløber for en længerevarende toksicitetsstudie, bør man i begge forsøg anvende samme stamme og fra samme kilde.

1.4.3.2. *Antal og køn*

Mindst 20 dyr (10 af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på ti dyr (fem af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

▼B

1.4.3.3. *Dosisstørrelse*

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.4.3.4). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde test-gruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis testkemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallelfodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af testkemikalium; virkningen på testkemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.4.3.4. *Grænsetest*

Et totalforsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænsetest er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dosisadministration**

Dyrene får testkemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Volumen bør ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt, undtaget vandige opløsninger, hvor man kan indgive 2 ml/100 g kropsvægt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i testvolumen begrænses ved justering af koncentrationen af testkemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

▼B

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når testkemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.2. **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i satellitgruppen, hvor man vil foretage »follow-up« -observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af undersøgelseslaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres, (men ikke som de eneste) er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, hårrejsning, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (1).

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet, passende udstyr bør udføres, før første gang testkemikaliet tilføres og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer, skal alle dyrene undersøges.

Hen imod slutningen af belastningsperioden og i hvert fald ikke tidligere end uge 11 foretages undersøgelser af reaktion på sensoriske stimuli af forskellig slags (1) (f.eks. auditoriske, visuelle og proprioceptive stimuli) (2), (3), (4), vurdering af gribestyrke (5) og af motorisk aktivitet (6). Nærmere detaljer af de procedurer, der kan foretages, findes i de respektive referencer. Andre, alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

Funktionsundersøgelser kan udelades nær forsøgets afslutning, hvis tilsvarende data kan findes i andre tilsvarende forsøg og de daglige kliniske undersøgelser ikke påviste funktionelle mangler.

▼B

Undtagelsesvis kan funktionsundersøgelser udelades på grupper, der på anden vis viser tegn på forgiftning i en grad, der vil have afgørende indflydelse på funktionsundersøgelserne.

1.5.2.1. *Kropsvægt og føde/vandindtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis testkemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikkeaktiviteten kan ændres herved.

1.5.2.2. *Hæmatologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Følgende hæmatologiske undersøgelser bør foretages ved forsøgets afslutning, og når blodprøver bliver indsamlet undervejs: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentrationen, erytrocyttal, leukocyttal og differentialtælling, trombocyttal og koagulationstid/koagulationsevnen.

Klinisk biokemiske analyser, som kan vise toksisk virkning på væv, specielt på lever og nyrer, skal udføres på blodprøver taget fra alle dyrene lige før eller i forbindelse med aflivningen (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget). På samme måde, som gælder for hæmatologiske prøver, undersøges også blodprøver taget undervejs. Det anbefales at tage fastende blodprøver ([1]). Analyser på serum og plasma bør inkludere: natrium, kalium, glukose, total kolesterol, carbamid, BUN, kreatinin, total protein og albumin, og mere end to enzymer, der belyser den hepatocellulære effekt (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk fosfatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Derudover kan inkluderes måling af andre enzymer (fra lever eller andetsteds), galdesure salte, som kan give nyttig information i visse tilfælde.

I den sidste uge af forsøget kan eventuelt følgende urinanalyser udføres, idet timediuresen måles: udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod eller blodceller.

Yderligere bør man overveje at måle serummarkører for generel vævsskade. Andre analyser, som bør udføres, hvis testkemikaliets egenskaber vides eller formodes at afficere beslægtede metaboliske markører, inkluderer calcium, fosfor, fastende triglycerider, specielle hormoner, methæmoglobin og kolinesterase. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikke-faste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor fødeindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Hvis blodprøver tages fastende, skal de tages efter udførelsen af de funktionelle observationer.

▼B

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

Hvis der ikke er tilstrækkeligt kendskab til de biokemiske eller hæmatologiske udgangsværdier, bør man overveje om disse analyser skal foretages, før belastningen begynder, men det anbefales almindeligvis ikke (7).

1.5.2.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyrene, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, uterus, ovarier, thymus, milt, hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, tyreoidea og paratyreoidea, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger (bevaret ved indblæsning med fiksativ og påfølgende neddypning), aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, galdeblære (mus), lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud og øjne (hvis oftalmologisk undersøgelse viste ændringer), Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.2.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelserne skal omfatte alle dyrene i de andre grupper, også hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit«-gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal inkludere følgende informationer:

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende testkemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

▼B

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— resultater af oftalmologisk undersøgelse

— vurdering, hvis muligt, af sanseaktiviteter, gribestyrke og motorisk aktivitet

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægtforholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt.

Diskussion af resultater

Konklusioner

3. **HENVISNINGER**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologie Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad. S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in lndustrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, pp. 691-704.

(4) Moser. V.C, Mc Daniel, K.M. Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, pp. 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C, Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, pp. 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L, Moser V.C, Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, pp. 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, pp. 198-201.

▼B

## B.27. SUBKRONISK ORAL TOKSICITETSTEST — ET 90-DAGES FORSØG OVER GENTAGNE ORALE DOSERS TOKSICITET PÅ IKKE-GNAVERE

### 1. METODE

Denne metode til udførelse af en subkronisk oral toksictetstest svarer til OECD TG 409 (1998).

### 1.1. INTRODUKTION

Efter at en akut eller gentagen 28-dages toksicitetstest er udført med henblik på primær vurdering af et kemisk stofs toksicitet, kan man udføre en subkronisk oral toksicitetstest, hvor man anvender gentagne doser til bestemmelse og evaluering af stoffets toksiske egenskaber. Undersøgelsen på 90 dage skaffer viden om mulige trusler mod sundheden, som kan opstå ved gentagen belastning i en periode med hurtig vækst, modning og den første del af voksenlivet. Undersøgelsen skaffer viden om større toksiske virkninger, peger på, hvilke organer der rammes og muligheden for akkumulation; den kan give et overslag over det belastningsniveau, der kan være skadeligt, uden at det bemærkes, som igen kan anvendes til valg af dosis til undersøgelser af kronisk effekt og til fastlæggelse af sikkerhedskriterier for, hvad mennesker kan tåle.

Undersøgelsesmetoder muliggør, at man på dyrearter, der ikke er gnavere, finder frem til negative virkninger ved belastning med kemikalier, og den bør kun bruges:

— hvor virkninger i andre undersøgelser peger på nødvendigheden af afklaring/karakterisering i en anden dyreart end gnavere, eller

— hvor toksiko-kinetiske undersøgelser peger på, at anvendelse af en speciel dyreart, der ikke er gnaver, er det mest relevante valg blandt laboratoriedyr, eller

— hvor andre specielle grunde retfærdiggør anvendelsen af dyrearter, der ikke er gnavere.

Se ligeledes den generelle indledning til del B.

### 1.2. DEFINITIONER

**Dosis:** Mængden af indgivet testkemikalium. Dosis angives som vægt (g, mg) eller som vægt af testkemikalium i forhold til dyrets vægt (f.eks. mg/kg) eller en konstant del af føden (ppm).

**Dosering:** Er et generelt udtryk for dosis, hyppighed af indgift og varigheden af indgiften.

**NOAEL:** Er en forkortelse for det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning, og er det højeste dosisniveau, hvor ingen negative virkninger, der kan tilskrives behandlingen, er fundet.

### 1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Testkemikaliet administreres peroralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr, idet hver gruppe får en bestemt dosis i en periode på 90 dage. I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på forgiftning. Dyr, der dør eller aflives, mens testen står på, bliver obduceret og ved undersøgelsens afslutning bliver resten af dyrene aflivet og obduceret.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den hyppigst anvendte ikke-gnaverdyreart er hunden, som bør være af en veldefineret race; beagle-hunde er ofte anvendt. Af andre arter bruges f.eks. også grise og minigrise. Primater anbefales ikke, og brug af dem skal forsvares. Der skal anvendes unge, sunde dyr, og for hunde bør belastningen begynde fortrinsvis ved 4- til 6-månedersalderen og ikke senere end ved 9-månedersalderen. Når der er tale om et primærforsøg efterfulgt af et langtidsforsøg med kronisk toksicitet, bør man anvende samme dyreart i begge forsøg.

1.4.2. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene og som ikke før har været anvendt til eksperimenter. Varigheden af tilvænning afhænger af den valgte dyreart og kilden. Mindst fem dage for hunde og grise, der er opdrættet til formålet og hører til i en stedlig koloni, men mindst to uger for disse dyr, hvis de kommer udefra. Dyrene beskrives hvad angår art, stamme, hvorfra de kommer (kilde), køn, vægt og/eller alder. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Bure skal anbringes, så deres placering får mindst mulig betydning. Hvert dyr tildeles et eget, særligt identifikationsnummer.

1.4.3. **Fremstilling af doser**

Stoffet, der skal undersøges, kan indgives via føden eller drikkevandet, ved hjælp af sonde eller i kapsler. Måden at indgive på gennem munden afhænger af undersøgelsens formål og testmaterialets fysisk-kemiske egenskaber.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes stoffet i et passende medie. Hvor muligt anbefales det først at forsøge at anvende vandige opløsninger eller opslæmninger; dernæst overvejes opløsninger eller opslæmninger i olie (f.eks. majsolie) og først derefter andre opløsnings-/opslæmningsmidler. For andre midler end vand bør de toksiske egenskaber kendes. Testkemikaliets stabilitet i forbindelse med indgiften bør fastslås.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Antal dyr og deres køn**

Mindst otte dyr (fire af hvert køn) bør anvendes for hvert dosisniveau. Hvis man planlægger at aflive nogle dyr undervejs i forsøget, skal antallet af dyr, der påbegynder forsøget, forøges tilsvarende. Antallet af dyr ved forsøgets afslutning må være tilstrækkelig stort, så evalueringen af den toksiske virkning er mulig. Ud fra tidligere opnået viden om kemikaliet eller nære analoge stoffer bør man overveje en yderligere »satellit«-gruppe på otte dyr (fire af hvert køn) i kontrollen og i gruppen med den højeste dosis, således at man efter forsøgsperioden kan observere evt. reversibilitet eller vedvarende følger af behandlingen. Varigheden af denne observationsperiode afhænger af, hvilke virkninger man vil følge.

▼B

1.5.2. **Dosisstørrelse**

Mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se 1.5.3). Dosisstørrelsen kan afhænge af tidligere tilsvarende forsøg eller forsøg med henblik på opsøgning af dosisgrænser og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende stoffer. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske natur eller biologiske effekt sætter grænser, bør den højeste dosisstørrelse vælges med henblik på toksisk virkning, men ikke på død eller alvorlig lidelse. Faldende dosisstørrelse bør vælges med henblik på at påvise en eventuel dosisrelateret virkning og det niveau, der ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL). To til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne.

Kontrolgruppen skal være en ubehandlet gruppe eller en gruppe, der får det eventuelle medie, i hvilket de behandlede dyr får kemikaliet. Bortset fra behandlingen skal dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen. Hvis kemikaliet indgives i et medie, skal kontrolgruppen have mediet i den størst anvendte mængde. Hvis testkemikaliet indgives via foderet, og hvis dette medfører reduceret fødeindtagelse, kan det være nyttigt med en gruppe, der parallelfodres mængdemæssigt, således at et eventuelt vægttab kan tilskrives, at foderet har en dårlig smag, respektive virker toksisk.

Man bør overveje mediets eller eventuelle additivers egenskaber med hensyn til absorption, distribution, stofskifte eller retention af testkemikalium; virkningen på testkemikaliets kemiske egenskaber, som igen kan have indflydelse på dets toksiske egenskaber; og indflydelsen på føde- eller vandindtag eller dyrenes ernæringsmæssige tilstand.

1.5.3. **Grænse-test**

Et totalforsøg med tre dosisstørrelser behøves næppe udført, hvis man ikke forventer nogen toksisk effekt ud fra kendskab til strukturelt beslægtede stoffer, og hvis der ikke ses nogen skadelig virkning ved forsøg som beskrevet ovenfor med enkelt dosis svarende til mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag. Grænsetest er konklusive, undtagen hvis belastning af mennesker indikerer nødvendigheden af anvendelse af en større dosis.

1.5.4. **Dosisadministration**

Dyrene får test-kemikaliet syv gange ugentlig hver uge i 90 dage. Ethvert andet regime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller passende intubationsrør. Det maksimale væskevolumen, der kan tilføres ad gangen, afhænger af dyrets størrelse. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt. Undtaget irritative og ætsende stoffer, som normalt vil have øget generende effekt ved større koncentrationer, bør variationen i testvolumen begrænses ved justering af koncentrationen af testkemikaliet for at sikre et konstant volumen ved alle dosisstørrelser.

▼B

Det er vigtigt at sikre, at de kvantiteter af kemikalier, som indtages via føden eller drikkevandet, ikke får indflydelse på den normale ernæring eller vandbalancen. Når testkemikaliet tilføres med føden, kan man tilføre det enten som en konstant del af føden (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets vægt; det, man vælger, skal specificeres. Tilføres kemikaliet via sonde eller kapsel, bør det gøres på samme tidspunkt hver dag, og dosisstørrelse skal rettes til, så den udgør en konstant størrelse i forhold til dyrets vægt. Hvis et 90-dages forsøg foretages som forløber for et langtids kronisk-toksicitetsforsøg, skal der i begge forsøg gives samme fødesammensætning.

1.5.5. **Observationer**

Observationsperioden skal mindst vare 90 dage. Dyrene i »satellit«-gruppen, hvor man vil foretage »follow-up« -observationer, skal beholdes i en passende periode uden behandling, med henblik på konstatering af fortsat eller ophør af toksisk virkning.

Almindelig klinisk observation bør foretages mindst en gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter indgift. Dyrenes kliniske tilstand bør noteres. Mindst to gange daglig, sædvanligvis morgen og aften, undersøges alle dyrene for tegn på morbiditet eller mortalitet.

I hvert fald før første belastning (for at tage højde for individuelle forskelle) og en gang ugentlig derefter bør detaljerede kliniske undersøgelse foretages af alle dyrene. Disse undersøgelser skal foretages, hvor det er praktisk muligt, uden for burene, på et standardareal og fortrinsvis på samme tid i hvert tilfælde. Man bør bestræbe sig på. at variationerne i observationsbetingelserne er mindst mulige. Blandt de fund, der skal noteres (men ikke som de eneste), er ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskreter og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, hårrejsning, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel skal også noteres.

Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres, før test-kemikaliet tilføres første gang og ved afslutning af forsøget, fortrinsvis på alle dyrene, men i hvert fald på dem, der fik højeste dosis og på kontrollerne. Hvis der opdages øjenforandringer. der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges.

1.5.5.1. *Kropsvægt og føde/vandindtagelse*

Alle dyr skal vejes mindst en gang ugentlig. Mængden af fødeindtagelse skal beregnes mindst en gang ugentlig. Hvis test-kemikaliet administreres via drikkevandet, skal vandindtagelsen beregnes mindst en gang ugentlig. Vandforbruget bør også tages i betragtning, når belastningen foretages via føden eller via sonde, da drikkeaktiviteten kan ændres herved.

▼B

1.5.5.2. *Hæmalologi og klinisk biokemi*

Stedet, hvor blodprøver tages, bør angives, og de bør gemmes på passende vis. Ved forsøgets afslutning tages der prøver lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene.

Hæmatologi, inkluderende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, tælling af røde og hvide blodlegemer, differentialtælling, trombocyttælling og et mål for koagulationsevnen, som f.eks. koagulationstid, protrombintid eller tromboplastintid, bør måles før forsøget påbegyndes, siden hver måned eller midtvejs i forsøget og endelig ved forsøgets afslutning.

Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle dyrene ved forsøgets begyndelse, siden enten hver måned eller midtvejs i forsøget og til sidst ved forsøgets afslutning. Man bør måle elektrolytbalancen, kulhydratstofskiftet og lever- og nyrefunktionen. Valg af særlige målinger vil afhænge af testkemikaliets virkningsmåde. Dyrene bør faste, afhængig af dyrearten, før blodprøvetagningen. Det foreslås, at man måler calcium, fosfor, klorid, kalium, natrium, fastende glukose, alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, ornitin decarboksylase, gammaglutamyl transpeptidase, carbamid, albumin, serumkreatinin, total bilirubin og total serumprotein.

Urinanalyser bør udføres i hvert fald ved begyndelsen, midtvejs og ved afslutningen af forsøget, med opsamling af timediuresen. Analyserne inkluderer udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, protein, glukose og blod/blodceller. Andre parametre kan inkluderes, hvor man finder det nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

Herudover bør man overveje måling af markører for generel vævsskade. Andre målinger, som kan være nødvendige for en tilstrækkelig toksikologisk vurdering, inkluderer analyser af lipider, hormoner, syre/base-balancen, methæmoglobin, og hæmning af kolinesterasen. Hvor det skønnes nødvendigt, kan andre biokemiske målinger inddrages for at udvide undersøgelsen af observerede virkninger. Disse bør måles i forbindelse med kemikalier af særlige typer eller fra tilfælde til tilfælde.

Almindeligvis må man have en fleksibel indstilling ud fra dyrearten og de observerede og/eller forventede virkninger af et givet kemikalium.

1.5.5.3. *Makroskopisk obduktion*

Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Lever med galdeblære, nyrer, binyrer, testes, bitestikler, ovarier, uterus, tyreoidea med paratyreoideae. thymus, milt hjerne og hjerte skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes moribunde og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

▼B

Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fiksationsmedie både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse: alle større læsioner, hjernen (repræsentative regioner, inklusive cerebrum, cerebellum og medulla/pons), rygmarven (fra tre niveauer: cervikal, midt-torakal og lumbal), hypofyse, øjne. tyreoidea, paratyreoideae, tymus, øsofagus, spytkirtlerne, mavesækken, tynd- og tyktarm, (inklusive de Peyerske plaques) lever, galdeblære, pankreas, nyrer, binyrer, milt, hjerte, luftrør og lunger, aorta, gonader, uterus, sekundære kønsorganer, brystkirtlerne fra hundyrene, prostata, urinblære, lymfeknuder (helst en lymfeknude, som dækker belastningsvejen, og en anden langt derfra for at dække den systemiske virkning), perifer nerve (ischiadicus eller tibialis) helst nær ved musklen, en sektion af knoglemarven (og/eller frisk knoglemarvsaspirat), hud. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres.

1.5.5.4. *Histopatologi*

En komplet histopatologisk undersøgelse skal udføres af de præserverede organer og væv på i hvert fald alle dyrene i kontrol- og højdosisgrupperne. Undersøgelsen skal omfatte alle dyrene i de andre gruppe også, hvis der observeres ændringer i højdosisgruppen, der kan tilskrives belastningen.

Alle større læsioner skal undersøges.

Hvis der anvendes en »satellit« -gruppe, skal der på dem udføres histopatologisk undersøgelse af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i den belastede gruppe.

## 2. DATA OG RAPPORTERING

### 2.1. DATA

Alle data skal anføres. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på forgiftning, en beskrivelse af disse tegn inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og forgiftningsgraden: det antal dyr. der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion.

Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget.

### 2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal inkludere følgende informationer:

▼B

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— indgivelsesmåde, som begrundes, hvis der ikke er tale om drikkevand.

2.2.2. **Dyreart:**

— anvendte art og stamme

— antal dyr, deres alder og køn

— kilde, opbevaringsforhold, føde osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

2.2.3. **Forsøgsbetingelser:**

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende test-kemikaliets form/opblanding i føden, resulterende koncentration, stabilitet og homogenitet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— sande dosis (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra test-kemikaliets koncentration i føde/vand (ppm) til sand dosis, hvis muligt

— detaljer vedrørende kvalitet af vand og føde.

2.2.4. **Resultater:**

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— fødeindtagelse og indtagelse af vand, om muligt

— data vedrørende forgiftning sat over for køn og dosis, inklusive forgiftningstegnene

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— oftalmologisk undersøgelse

— hæmatologiske målinger med relevante udgangsværdier

— klinisk-biokemiske målinger med relevante udgangsværdier

— slutvægt, organernes vægt og organ/kropsvægtforholdene

— sektionsfund

— en detaljeret beskrivelse af de histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes

— statistisk behandling af resultaterne, hvor rimeligt

Diskussion af resultater

Konklusioner

▼B

B.28. **SUBKRONISK TOKSICITET, OPTAGELSE GENNEM HUDEN — 90 DAGES GENTAGEN DOSERING PÅ HUD UNDER ANVENDELSE AF GNAVERE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Teststoffet påføres dagligt huden på grupper af forsøgsdyr, idet der gives en bestemt gradueret dosis til hver gruppe gennem en periode på 90 dage. Dyrene observeres dagligt i forsøgsperioden. Eventuelle tegn på toksicitet registreres. De dyr, der dør under forsøget eller aflives ved afslutningen af forsøget, obduceres.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forberedelser**

Dyrene holdes under forsøgsbetingelserne med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage inden forsøget påbegyndes. Unge, sunde, dyr fordeles randomiseret i grupper. Kort før forsøget indledes, klippes pelsen på ryggen på forsøgsdyrene. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Klipningen eller barberingen må som regel gentages med en uges mellemrum. Man må ved klipning eller barbering passe på ikke at beskadige huden. Mindst 10 % af dyrets overflade skal kunne anvendes til påføring af teststoffet. Ved afgørelse af, hvilket og hvor stort et område, der skal klippes, bør der tages hensyn til dyrets vægt. Ved testning af faste stoffer, som — hvis det er hensigtsmæssigt — kan pulveriseres, skal teststoffet fugtes tilstrækkeligt med vand eller om nødvendigt med et passende vehikel for at sikre god kontakt med huden. Flydende teststoffer påføres normalt ufortyndet. Der skal anvendes daglig applikation fem til syv dage ugentligt.

1.6.2. *Forsøgsbetingelser*

1.6.2.1. Forsøgsdyr

Der kan anvendes voksne rotter eller kaniner. Der kan anvendes andre dyrearter, men i så fald skal dette være begrundet. Der benyttes dyr af almindeligt anvendte stammer, For begge køn af forsøgsdyr gælder det, at variationen i deres vægt ikke må overskride ± 20 % af en rimelig gennemsnitsvægt. Hvis en undersøgelse af subkronisk toksicitet udføres som et forstudium til en langtidsundersøgelse, bør samme dyreart og stamme anvendes i begge undersøgelser.

▼B

1.6.2.2. Antal og køn

Der anvendes mindst 20 dyr (10 hunner og 10 hanner) med sund hud til hvert dosisniveau. Hunnerne må ikke have født og må ikke være drægtige. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, skal det oprindelige antal dyr forøges med det antal dyr, man påregner at aflive i løbet af forsøget. Man kan samtidig udsætte en satellitgruppe på 20 dyr (10 af hvert køn) for den højeste koncentration i 90 dage og gennem en periode på 28 dage efter forsøget observere, om der er reversible, varige eller sent opståede toksiske virkninger.

1.6.2.3. Dosisniveauer

Der skal anvendes mindst tre dosisniveauer samt en kontrolgruppe eller en vehikelkontrolgruppe, såfremt der benyttes vehikel. Eksponeringsperioden er på mindst seks timer dagligt. Teststoffet påføres på omtrent samme tidspunkt hver dag, og doserne justeres med jævne mellemrum (én gang eller to gange om ugen), så de er konstante i forhold til dyrenes legemsvægt. Dyrene i kontrolgruppen behandles nøjagtigt som dyrene i forsøgsgrupperne, bortset fra påføring af teststoffet. Hvis der anvendes et vehikel til at lette doseringen, skal vehikelkontrolgruppen eksponeres på samme måde som forsøgsgrupperne og påføres samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Den højeste dosis bør have toksisk virkning, men kun medføre få eller ingen dødsfald. Det laveste dosisniveau bør ikke have nogen toksisk virkning overhovedet. Hvis der foreligger en anvendelig vurdering af menneskers eksponering for stoffet, skal det laveste dosisniveau overskride denne eksponering. Middeldosis skal helst frembringe så svage observerbare toksiske virkninger som muligt. Hvis der anvendes mere end tre dosisniveauer, bør de vælges således, at der opnås graduering af de toksiske virkninger. I grupperne med lav og middel dosis og i kontrolgrupperne skal dødeligheden holdes på et lavt niveau, så der bliver mulighed for en meningsfuld vurdering af resultaterne.

Hvis teststoffet forårsager alvorlig hudirritation, bør koncentrationen sænkes, og der kan derved ske en reduktion eller et fuldstændigt bortfald af de øvrige toksiske effekter på den højeste dosis. Hvis huden er blevet alvorligt beskadiget, kan det være nødvendigt at afbryde forsøget og foretage et nyt forsøg med en lavere koncentration.

1.6.3. Grænsetest

Hvis et dosisniveau på 1 000 mg/kg legemsvægt eller et højere dosisniveau fastsat ud fra kendskabet til den eventuelle eksponering, mennesker udsættes for, ikke giver nogen toksisk virkning, kan yderligere forsøg betragtes som unødvendige.

1.6.4. Observationsperiode

Dyrene observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet. Dødstidspunkt og tidspunkt for toksicitetstegns optræden og forsvinden skal registreres.

▼B

1.6.5. *Fremgangsmåde*

Dyrene skal holdes i hvert sit bur. Den ideelle doseringer påføring af teststoffet syv dage om ugen i en periode på 90 dage.

Eventuelle satellitgrupper beregnet til efterfølgende observationer bør holdes under observation i yderligere 28 dage, efter at påføringen af teststoffet er afsluttet, således at man har mulighed for at registrere, om toksiske virkninger er reversible eller om de persisterer. Eksponitionsperioden skal være seks timer dagligt.

Teststoffet påføres jævnt over et område, som svarer til ca. 10 % af den samlede kropsoverflade. Med stærkt toksiske stoffer kan der anvendes et mindre område, men stoffet bør påføres så tyndt og ensartet og over så stor en del af området som muligt.

Teststoffet holdes i kontakt med huden ved hjælp af en porøs gazeforbinding og en ikke-hudirriterende klæbestrimmel. Teststedet skal desuden dækkes på en sådan måde, at gazeforbindingen og teststoffet holdes sikkert fast, så det sikres, at dyrene ikke indtager teststoffet. Der kan anvendes andre foranstaltninger, som forhindrer dyrene i at indtage teststoffet, men man bør ikke immobilisere dem fuldstændigt.

Ved eksponeringsperiodens slutning fjernes eventuelt tilbagesiddende teststof, idet der anvendes vand eller en anden egnet metode til at rense huden.

Alle dyr observeres dagligt, og det registreres, om der optræder tegn på toksicitet, hvornår disse tegn optræder første gang, hvor længe de varer, og hvor kraftige de er. Inspektion af dyrene skal omfatte forandringer i hud og pels, øjne og slimhinder, åndedræt og kredsløb, det autonome og centrale nervesystem, den motoriske aktivitet og adfærdsmønstret. Der holdes ugentligt regnskab med foderindtagelsen, og dyrene vejes en gang om ugen. Dyrene observeres med jævne mellemrum med henblik på, at det mindst mulige antal dyr går tabt for undersøgelsen på grund af f.eks. kannibalisme, autolyse af væv eller forveksling. Ved forsøgets afslutning aflives og obduceres alle tilbageværende dyr med undtagelse af satellitgrupperne. Døende dyr skal fjernes og obduceres, så snart de registreres.

Alle dyr inklusive kontrolgruppen underkastes normalt følgende undersøgelser:

a) Oftalmologisk undersøgelse med anvendelse af et oftalmoskop eller lignende passende udstyr skal foretages inden påføring af teststoffet og ved undersøgelsens afslutning. Det må foretrækkes, at alle dyr undersøges, men sker dette ikke, undersøges mindst den gruppe, der påføres den højeste dosis og kontrolgruppen. Hvis der observeres forandringer i øjnene, skal alle dyrene undersøges.

b) Hæmatologiske undersøgelser omfattende hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erytrocyttælling, total og differential leukocyttælling, måling af koaguleringsevne f.eks. koagulationstid, protrombintid, tromboplastintid eller blodpladetælling skal foretages ved forsøgets afslutning.

▼B

c) Klinisk biokemisk analyse af blod skal foretages ved afslutningen af forsøget. Relevante analyseområder for alle forsøg er elektrolytbalance, kulhydratstofskifte, lever- og nyrefunktion. Valg af specifikke test afhænger af observationer af teststoffets virkning. Følgende bestemmelser kan foreslås: kalcium, fosfor, klorid, natrium, kalium, fasteglukose (fasteperioden vil afhænge af dyrearten), serum alanin aminotransferase (ALAT), serum aspartat aminotransferase (ASAT), ornitin decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase, urinstof, albumin, kreatinin, total bilirubin og total serumprotein. Andre bestemmelser, der kan være påkrævede i en adækvat toksikologisk vurdering, omfatter lipidanalyser, hormonanalyser, syre/basebalance, methæmoglobin, cholinesteraseaktivitet. Der kan anvendes yderligere kliniskbiokemisk analyse, hvor det skønnes nødvendigt for en videre undersøgelse af de observerede virkninger.

d) Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger.

Hvis historiske basaldata er inadækvate, skal man gøre sig overvejelser over anvendelsen af hæmatologiske og klinisk biokemiske parametre, inden forsøget begynder.

Makroskopisk undersøgelse

Alle forsøgsdyrene skal underkastes en fuldstændig makroskopisk vurdering, der omfatter undersøgelse af kropsoverflade, alle kropsåbninger og kranie-, thorax- og abdominalhulerne og deres indhold. Lever, nyrer, binyrer og testikler vejes så hurtigt som muligt efter dissektion for at undgå udtørring, Følgende væv og organer skal opbevares i et passende medium med henblik på mulig senere histopatologisk undersøgelse: alle væv og organer, som udviser læsioner, hjerne, herunder snit af medulla/pons, den cerebellare og cerebrale cortex, hypofyse, skjoldbrusk/biskjoldbruskkirtel, thymusvæv, (trakea), lunger, hjerte, aorta, spytkirtler, lever, milt, nyrer, binyrer, bugspytkirtel, kønskirtler, uterus, assesoriske kønskirtler, galdeblære (hvis den findes), spiserør, mavesæk, duodenum, jejunum, ileum, coecum, tyktarm, endetarm, urinblære, en repræsentativ lymfeknude, (kvindelig brystkirtel), (lårmuskulatur), perifer nerve, (øjne), (sternum med benmarv), (femur inklusive ledflade), (rygmarv i tre forskellige snit — cervikalt, midt for thorax og lumbalt) og (exorbitale tårekirtler). Væv, der er nævnt i parentes, behøver kun undersøges, hvis der er tale om toksicitetstegn eller kan sættes i forbindelse med målorganer.

Histopatologiske undersøgelser

a) Der skal foretages en fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organer og væv fra dyrene i kontrolgruppen og i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis.

b) Alle alvorlige læsioner skal undersøges.

▼B

c) Målorganer skal også undersøges i øvrige doserede grupper.

d) Når der anvendes rotter, undersøges lungerne fra dyrene i den lavest doserede og de middeldoserede grupper histopatologisk med henblik på konstatering af tegn på infektion, idet dette giver en egnet vurdering af dyrenes helbredstilstand. Der er ikke rutinemæssigt behov for yderligere histopatologiske undersøgelser af dyrene i disse grupper, men organer, som viser tegn på læsioner i den gruppe, der har fået påført den højeste dosis, skal altid undersøges.

e) Dyrene i en eventuel satellitgruppe skal underkastes en histopatologisk undersøgelse af de væv og organer, der udviser toksisk påvirkning i de øvrige grupper.

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal dyr med læsioner og for hver type af læsioner den procentdel dyr, der udviser den pågældende læsion, Evaluering af resultaterne skal baseres på en passende statistisk metode. Alle anerkendte statistiske metoder kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— dyreart, stamme, herkomst, miljøbetingelser, foder osv.

— forsøgsbetingelser

— dosisniveauer (med angivelse af vehikel, hvor et sådant er anvendt) samt koncentration

— oplysninger om toksisk reaktion inddelt efter køn og dosis

— ikke toksisk dosis, hvis en sådan er konstateret

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse af forsøgsdyr til forsøgets slutning

— toksiske eller andre virkninger

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder og vægt

— oftalmologiske fund

— hæmatologiske undersøgelser og samtlige resultater

— klinisk biokemiske analyser og samtlige resultater (herunder resultater af urinanalyse)

— obduktionsfund

▼B

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼M4

B.29. **SUBKRONISK TOKSICITET (INHALATION): 90-DAGES FORSØG**

RESUMÉ

Denne reviderede testmetode B.29 har til formål at tilvejebringe en fuld karakterisering af testkemikaliets toksicitet ved inhalation i en subkronisk varighed (90 dage) og at fremskaffe robuste data til kvantitative inhalationsrisikovurderinger. Grupper bestående af 10 hangnavere og 10 hungnavere eksponeres i seks timer om dagen i 90 dage (13 uger) for a) testkemikaliet ved tre eller flere koncentrationsniveauer, b) filtreret luft (negativ kontrol) og/eller c) vehiklet (vehikelkontrol). Dyr eksponeres generelt fem dage om ugen, men eksponering i syv dage om ugen tillades også. Hanner og hunner testes altid, men de eksponeres muligvis ved forskellige koncentrationsniveauer, hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie. Denne metode giver forsøgslederen fleksibilitet til at medtage satellitgrupper (reversibilitet), aflivninger under forsøget, bronchieskylning (BAL), neurologiske test og yderligere kliniske patologiske og histopatologiske evalueringer med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet.

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline 413 (2009). Den oprindelige Test Guideline 413 (TG 413) for subkronisk toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 (1). Denne testmetode B.29 (som svarer til den reviderede TG 413) er blevet opdateret, så den afspejler det videnskabelige niveau og for at opfylde nuværende og fremtidige lovgivningskrav.

2. Forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation bruges primært til at fastlægge lovgivningsmæssige koncentrationer med henblik på at vurdere risici for arbejdstagere på arbejdspladsen. De bruges også til at vurdere risikoen for mennesker i boliger, ved transport og miljøet. Denne metode gør det muligt at karakterisere negative virkninger efter gentagen daglig inhalationseksponering for et testkemikalie i 90 dage (ca. 10 % af en rottes levetid). Data, der udledes af forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation, kan bruges til kvantitative risikovurderinger og til udvælgelse af koncentrationer til kroniske forsøg. Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af nanomaterialer. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document 39 (2).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

3. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Informationer, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Hvis neurotoksicitet forventes eller observeres i løbet af forsøget, kan forsøgslederen vælge at inkludere relevante evalueringer, som f.eks. FOB (Functional Observational Battery) og måling af motorisk aktivitet. Selv om tidspunkterne for eksponering kan være afgørende i forhold til de specifikke undersøgelser, må gennemførelsen af disse ekstra aktiviteter ikke påvirke det grundlæggende forsøgsdesign.

▼M4

4. Fortyndinger af ætsende eller irriterende testkemikalier kan testes ved koncentrationer, der giver den ønskede toksicitetsgrad. Se GD 39 (2) for yderligere oplysninger. Når dyr eksponeres for sådanne materialer, bør målkoncentrationerne være så lave, at de ikke medfører udtalt smerte og lidelse, men de bør alligevel være tilstrækkelige til at hæve koncentrations-responskurven til et niveau, der opfylder testens lovgivningsmæssige eller videnskabelige formål. Disse koncentrationer bør vælges i det enkelte tilfælde, fortrinsvis på grundlag af målrettede dosisbestemmende forsøg (»range finding«), der giver information om den kritiske effektparameter, irritationstærskel og tidspunkt for indtræden (se afsnit 11-13). Der gives en begrundelse for valget af koncentration.

5. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant. Dyr, som er døende, betragtes på samme måde som dyr, der dør i løbet i forsøget. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (3).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

6. Der anvendes raske unge gnavere af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Rotten er det foretrukne forsøgsdyr. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes andre dyrearter.

**Forberedelse af dyrene**

7. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På randomiseringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem syv og ni uger gamle. Deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets start, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

**Dyreopdræt og -sundhed**

8. Dyrene identificeres individuelt med subkutane transpondere, hvis det er muligt, for at lette observationer og undgå forvirring. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

▼M4

**Inhalationskamre**

9. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (2).

TOKSICITETSFORSØG

**Grænsekoncentrationer**

10. I modsætning til forsøg med akut toksicitet er der ingen definerede grænsekoncentrationer i forsøg med subkronisk toksicitet ved inhalation. Den testede maksimumskoncentration baseres på: 1) den højest opnåelige koncentration, 2) »worst case« eksponeringsniveau for mennesker, 3) behovet for at sikre tilstrækkelig iltforsyning og/eller 4) hensyn til dyrevelfærd. Hvis der ikke foreligger databaserede grænser, kan de akutte grænser i forordning (EF) nr. 1272/2008 (13) anvendes (dvs. op til en maksimumskoncentration på 5 mg/l for aerosoler, 20 mg/l for dampe og 20 000 ppm for gasser); se GD 39 (2). Det gives en begrundelse, hvis det er nødvendigt at overskride disse grænser ved test af gasser eller meget flygtige testkemikalier (f.eks. kølemidler). Grænsekoncentrationen bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

**Dosisbestemmende forsøg**

11. Inden hovedforsøget påbegyndes, er det oftest nødvendigt at udføre et dosisbestemmende forsøg (»range finding«). Et dosisbestemmende forsøg er mere omfattende end et forforsøg, fordi det ikke er begrænset til valg af koncentration. Viden, der opnås fra et dosisbestemmende forsøg, kan resultere i et vellykket hovedforsøg. Et dosisbestemmende forsøg kan f.eks. fremskaffe teknisk information om analysemetoder, partikelstørrelsesfordeling, opdagelse af toksiske mekanismer, klinisk patologi og histopatologiske data samt estimeringer af de mulige NOAEL- og MTC-koncentrationer i et hovedforsøg. Forsøgslederen kan vælge at bruge det dosisbestemmende forsøg til at identificere tærsklen for irritation af luftvejene (f.eks. ved hjælp af histopatologisk undersøgelse af luftvejene, lungefunktionstest eller bronchieskylning), den øvre koncentration, der tåles uden unødig belastning af dyrene, og de parametre, der bedst karakteriserer et testkemikalies toksicitet.

12. Et dosisbestemmende forsøg kan omfatte et eller flere koncentrationsniveauer. Afhængigt af de valgte effektparametre eksponeres 3-6 hanner og 3-6 hunner ved hvert koncentrationsniveau. Et dosisbestemmende forsøg bør vare mindst fem dage og generelt højst 28 dage. En begrundelse for valget af koncentrationer til hovedforsøget gives i forsøgsrapporten. Formålet med hovedforsøget er at påvise et forhold mellem koncentration-respons med udgangspunkt i det, der forventes at være den mest sensitive effektparameter. Den laveste koncentration bør ideelt være en NOAEL-koncentration, mens den højeste koncentration bør fremkalde klar toksicitet uden at forårsage unødig stress for dyrene eller påvirke deres levetid (3).

▼M4

13. Når koncentrationerne vælges til det dosisbestemmende forsøg, anvendes alle tilgængelige informationer, herunder data om forholdet mellem struktur og aktivitet og data vedrørende lignende kemikalier (se afsnit 3). Et dosisbestemmende forsøg kan bekræfte/afvise, hvad der betragtes som de mest sensitive mekanistisk baserede effektparametre, f.eks. organofosfaters hæmning af kolinesterasen, erythrocytotoksiske stoffers dannelse af methæmoglobin, thyreoideahormoner ($T_3$, $T_4$) for thyreotoksikanter, protein, eller neutrofiler i bronchieskylning for uskadelige svært opløselige partikler eller lungeirriterende aerosoler.

**Hovedforsøg**

14. Hovedforsøget vedrørende subkronisk toksicitet omfatter generelt tre koncentrationsniveauer og også en samtidig negativ kontrolgruppe (luft) og/eller vehikelgruppe, hvis det er nødvendigt (se afsnit 18). Alle tilgængelige data bør anvendes som hjælp til at vælge hensigtsmæssige eksponeringssniveauer, herunder resultaterne af systemiske toksicitetsforsøg, metabolisme og kinetik (der bør lægges særlig vægt på at undgå høje koncentrationsniveauer, der mætter kinetiske processeer). Hver testgruppe består af 10 hangnavere og 10 hungnavere, der eksponeres for testkemikaliet i seks timer om dagen i fem dage om ugen i en periode på 13 uger (samlet forsøgsvarighed på mindst 90 dage). Dyr kan også eksponeres i syv dage om ugen (f.eks. ved test af inhalerede lægemidler). Hvis det vides, at det ene køn er mere modtageligt for et bestemt testkemikalie, kan kønnene eksponeres ved forskellige koncentrationsniveauer for at observere forholdet mellem koncentration-respons som beskrevet i afsnit 15. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end 6 timer/dag, eller når det er nødvendigt at gennemføre et forsøg med langvarig helkropseksponering (f.eks. 22 timer/dag) [se GD 39 (2)]. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden, medmindre eksponeringen varer længere end seks timer. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

15. De valgte målkoncentrationer bør identificere målorganet (-organerne) og påvise et klart forhold mellem koncentration og respons:

— Det højeste koncentrationsniveau bør medføre toksiske virkninger, men ikke medføre langvarige symptomer eller letalitet, som kan forhindre en meningsfuld evaluering.

— De mellemste koncentrationsniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes graduerede toksiske effekter mellem effekterne ved den laveste og den højeste koncentration.

— Det laveste koncentrationsniveau bør kun have ringe eller ingen toksisk virkning.

**Aflivninger under forsøget**

16. Hvis der påregnes aflivning af dyr under forsøget, bør antallet af dyr på hvert eksponeringsniveau forøges med det antal dyr, der aflives, inden forsøget afsluttes. Der gives en begrundelse for aflivning under forsøget, og der redegøres for aflivningerne i statistiske analyser.

▼M4

**Satellitforsøg (reversibilitetsforsøg)**

17. Et satellitforsøg (reversibilitetsforsøg) kan bruges til at observere reversibilitet, persistens eller forsinket indtræden af toksicitet i mindst 14 dage efter behandlingen. Satellitgrupper består af 10 hanner og 10 hunner, der eksponeres samtidig med forsøgsdyrene i hovedforsøget. Satellitforsøgsgrupper bør eksponeres for testkemikaliet ved det højeste koncentrationsniveau, og der bør efter behov være samtidige luft- og/eller vehikelkontrolgrupper (se afsnit 18).

**Kontroldyr**

18. Dyr i den samtidige negative (luft)kontrolgruppe bør behandles på samme måde som forsøgsdyrene, bortset fra at de eksponeres for filtreret luft i stedet for testkemikaliet. Hvis vand eller et andet stof bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe inkluderes i forsøget i stedet for en negativ (luft)kontrolgruppe. Vand bør så vidt muligt anvendes som vehikel. Når vand bruges som vehikel, eksponeres kontroldyrene for luft med samme fugtighed som de eksponerede grupper. Valget af et hensigtsmæssigt vehikel baseres på et korrekt gennemført forforsøg eller historiske data. Hvis et vehikels toksicitet ikke er velkendt, kan forsøgslederen vælge at bruge en negativ (luft)kontrol og en vehikelkontrol, men det frarådes på det kraftigste. Hvis historiske data viser, at vehiklet er ikke-toksisk, er der ikke behov for en negativ (luft)kontrolgruppe, og der anvendes kun en vehikelkontrol. Hvis et forforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration, og at denne vehikelkontrol bør anvendes.

EKSPONERINGSBETINGELSER

**Administration af koncentrationer**

19. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer. Partikelformige materialer kan underkastes mekaniske processer for at reducere partikelstørrelsen. Nærmere detaljer findes i GD 39 (2).

**Partikelstørrelsesfordeling**

20. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 3 μm med en geometrisk standardafvigelse ($\sigma_g$) i området fra 1,5 til 3,0 (4). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler og fibre kan overstige den.

▼M4

**Fremstilling af testkemikalie i vehikel**

21. Ideelt testes testkemikaliet uden et vehikel. Hvis det er nødvendigt at bruge et vehikel til at frembringe en passende koncentration og partikelstørrelse af testkemikaliet, bør der fortrinsvis anvendes vand. Når et testkemikalie er opløst i et vehikel, skal dets stabilitet påvises.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

**Luftgennemstrømning i kammer**

22. Luftgennemstrømningen gennem eksponeringskammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Realtidsovervågning af koncentrationen (eller den tidsmæssige stabilitet) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for inhalation. Hvis koncentrationen overvåges i realtid, kan frekvensen for måling af luftgennemstrømning reduceres til én måling pr. eksponering pr. dag. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås. Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at denne standard ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles. Hvis målinger på den første eksponeringsdag viser, at disse gasser er på passende niveauer, kræves der ikke yderligere målinger.

**Kammerets temperatur og relative fugtighed**

23. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres hver time under eksponering, hvis det er muligt. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

**Testkemikalie: nominel koncentration**

24. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem inhalationskammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

**Testkemikalie: faktisk koncentration**

25. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet målt ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver

▼M4

dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode.

26. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet i hele forsøgets varighed, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

27. Eksponeringsatmosfæren skal være så konstant som praktisk muligt. Apparatur til realtidsovervågning, f.eks. et aerosolfotometer til måling af aerosoler eller en kulbrinteanalysator til dampe, kan bruges til at påvise eksponeringsbetingelsernes stabilitet. Den faktiske koncentration i kammeret måles mindst tre gange i løbet af hver eksponeringsdag for hvert eksponeringsniveau. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan én prøve pr. eksponeringsperiode accepteres. Ideelt udtages denne prøve over hele eksponeringsperioden. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer ($t_{95}$) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres. Det omfatter den tid, der kræves for at opnå ækvilibrering af kammeret ($t_{95}$) og henfald. Vejledning i beregning af $t_{95}$ findes i GD 39 (2).

28. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe, og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af specialdrevne slutprodukter/-apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer. Der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for blandingen som helhed og ikke kun for det aktive stof eller indikatorstoffet (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (2).

**Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling**

29. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst ugentligt for hvert koncentrationsniveau ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse (APS). Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget.

▼M4

30. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (2)]. Hvis ækvivalens kan påvises ved alle de koncentrationer, der testes i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage et forsøg.

31. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser.

OBSERVATIONER

32. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk før, under og efter eksponeringsperioden. Hyppigere observationer kan være påkrævet afhængigt af dyrenes respons på eksponeringen. Hvis observation af dyrene hindres af fastspændingsslanger på dyrene, dårligt belyste helkropskamre eller uigennemsigtige atmosfære, observeres dyrene omhyggeligt efter eksponering. Observationer inden næste dags eksponering kan omfatte vurdering af reversibilitet eller forværring af toksiske virkninger.

33. Alle observationer registreres, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

34. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab. Forsøgsprotokollen kan omfatte yderligere vurderinger, f.eks. kinetik, bioovervågning, lungefunktion, retention af tungtopløselige stoffer, der akkumuleres i lungevæv, og adfærdsændringer.

KROPSVÆGT

35. Det enkelte dyrs vægt registreres kort før den første eksponering (dag 0) og derefter to gange om ugen (f.eks. hver fredag og mandag for at påvise restitution i løbet af en eksponeringsfri weekend eller med et tidsinterval, der gør det muligt at vurdere systemisk toksicitet), og på døds- eller aflivningstidspunktet. Hvis der ikke er nogen virkninger i de første fire uger, måles kropsvægten ugentligt i resten af forsøgsperioden. Hvis der anvendes satellitdyr (reversibilitet), vejes de ugentligt i hele restitutionsperioden. Ved forsøgets afslutning vejes alle dyr umiddelbart inden aflivning med henblik på at beregne forholdet mellem organ- og kropsvægt uden bias.

INDTAGELSE AF FØDE OG VAND

36. Foderindtagelse måles ugentligt. Vandindtagelse kan også måles.

▼M4

KLINISK PATOLOGI

37. Klinisk patologisk vurdering foretages for alle dyr, herunder kontrol- og satellitdyr (reversibilitet), når de aflives. Tidsintervallet med den sidste eksponering og blodtapning registreres, navnlig når den undersøgte effektparameter hurtigt rekonstitueres. Prøvetagning efter eksponering er indiceret for parametre med en kort plasmahalveringstid (f.eks. COHb, CHE og MetHb).

38. I tabel 1 vises de kliniske patologiske parametre, der generelt kræves i forbindelse med alle toksikologiforsøg. Rutinemæssig urinanalyse er ikke påkrævet, medmindre den indiceres af forventede eller observerede toksiske virkninger. Forsøgslederen kan vælge at undersøge yderligere parametre med henblik på at opnå en bedre karakterisering af testkemikaliets toksicitet (f.eks. cholinesterase, lipider, hormoner, syre/basebalance, methæmoglobin eller Heinz-legemer, kreatinkinase, myeloid/erythroid-forhold, troponiner, arterielle blodgasser, lactatdehydrogenase, sorbitaldehydrogenase, glutamatdehydrogenase og γ-glutamyltranspeptidase).

*Tabel 1*

**Standardparametre for klinisk patologi**

| Hæmatologisk undersøgelse | |
|---|---|
| Erythrocyttælling | Leukocyttal |
| Hæmatokrit | Differentialtælling |
| Hæmoglobinkoncentration | Trombocyttal |
| Middelcellehæmoglobin | Koaguleringsevne (vælg én): |
| Middelcellevolumen | — protrombintid |
| Middelcellehæmoglobinkoncentration | — koaguleringstid |
| Retikulocyttælling | — partiel tromboplastintid |
| **Klinisk-kemisk undersøgelse** | |
| Glukose (*) | Alanin-aminotransferase |
| Total kolesterol | Aspartat-aminotransferase |
| Triglycerider | Alkalisk fosfatase |
| BUN | Kalium |
| Total bilirubin | Natrium |
| Kreatinin | Kalcium |
| Total protein | Fosfor |
| Albumin | Chlorid |
| Globulin | |
| **Urinanalyse (valgfri)** | |
| Udseende (farve og turbiditet) | Total protein |
| Volumen | Glukose |
| Specifik vægtfylde eller osmolalitet | Blod/blodceller |
| pH | |

(*) Da en langvarig fasteperiode kan medføre bias i glukosemålinger hos de behandlede dyr i forhold til kontroldyrene, afgør forsøgslederen, om det er hensigtsmæssigt, at dyrene faster. Hvis en fasteperiode anvendes, bør den tilpasses den anvendte art. For rotter kan den være 16 timer (natten over). Bestemmelse af fasteglukose kan foretages efter faste natten over i løbet af den sidste eksponeringsuge eller efter faste natten over inden obduktion (i sidstnævnte tilfælde samme med alle de øvrige kliniske patologiske parametre).

▼**M4**

39. Når der er bevis for, at de nedre luftveje (dvs. alveolerne) er det primære afsætnings- og retentionssted, kan bronchieskylning (BAL) anvendes til kvantitativt at analysere hypotesebaserede parametre for dosis/virkning med fokus på alveolitis, lungebetændelse og fosfolipidose. Det gør det muligt at undersøge forandringer i dosis/respons og tidsforløb i forbindelse med alveoleskader. BAL-væsken kan analyseres for total og differentieret leukocyttal, total protein og lactat-dehydrogenase. Andre parametre, der kan overvejes, er parametre, der indicerer lysosomale skader, fosfolipidose, fibrose og irritationsinflammation eller allergisk inflammation, som kan omfatte bestemmelse af pro-inflammatoriske cytokiner/kemokiner. BAL-målinger supplerer generelt resultaterne af histopatologiske undersøgelser, men kan ikke erstatte dem. Vejledning i udførelse af lungeskylning findes i GD 39 (2).

OFTALMOLOGISK UNDERSØGELSE

40. Ved hjælp af et oftalmoskop eller et tilsvarende instrument foretages oftalmologiske undersøgelser af fundus, refraktionsmedier, iris og conjunctivae for alle dyr inden administration af testkemikaliet og for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkoncentration ved forsøgsafslutning. Hvis der observeres forandringer i øjnene, undersøges alle dyr i de andre grupper, herunder satellitgruppen (reversibilitet).

MAKROSKOPISKE PATOLOGISKE FORANDRINGER OG ORGANVÆGT

41. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes komplet exsanguination (hvis muligt) og makroskopisk obduktion. Tidsrummet mellem afslutningen på hvert dyrs sidste eksponering og dets aflivning registreres. Hvis obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

42. I tabel 2 vises de organer og væv, der skal præserveres i et passende medium under makroskopisk obduktion med henblik på mulig histopatologisk undersøgelse. Forsøgslederen afgør, om organer og væv i [kantet parentes] og andre organer og væv skal præserveres. Organer i **fed** trimmes og vejes i våd tilstand så hurtigt som muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. Skjoldbruskkirtel og bitestikler bør kun vejes, hvis artefakter fra trimming kan hindre histopatologisk evaluering. Væv og organer fikseres i 10 % bufret formalin eller et andet egnet fikseringsmiddel, straks obduktion er udført, men højst 24-48 timer inden trimming afhængigt af det anvendte fikseringsmiddel.

▼M4

*Tabel 2*

**Organer og væv, der præserveres under makroskopisk obduktion**

| | |
|---|---|
| **Binyrer** | Øsofagus |
| Aorta | [Bulbus olfactorius] |
| Knoglemarv (og/eller nyligt aspirat) | **Æggestokke** |
| **Hjerne** (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | Bugspytkirtler |
| Cæcum | Paratyreoideae |
| Tyktarm | Perifer nerve (ischias- eller tibianerven), om muligt tæt på musklen |
| Duodenum | Hypofyse |
| [**Bitestikler**] | Prostata |
| [Øjne (retina, synsnerve) og øjenlåg] | Rectum |
| Femur og knæled | Spytkirtler |
| Galdeblære (hvis en sådan forefindes) | Vesiculae seminales |
| [Harderian-kirtler] | Hud |
| **Hjerte** | Rygmarv (cervikal, midt-torakal og lumbal) |
| Ileum | **Milt** |
| Jejunum | Sternum |
| **Nyrer** | Mavesæk |
| [Tårekirtler (ekstraorbitale)] | Tænder |
| Larynx (3 niveauer, herunder basis af strubelåget) | **Testikler** |
| **Lever** | **Brisler** |
| **Lunge** (alle lungelapper på et niveau, herunder hovedbronchier) | **Skjoldbruskkirtlen** |
| Lymfeknuder fra lungens hilum, navnlig ved tungtopløselige testkemikalier. Ved mere detaljerede undersøgelser og/eller forsøg med immunologisk fokus kan yderligere lymfeknuder overvejes, f.eks. lymfeknuder fra de mediastinale, cervikale/submandibulære og/eller aurikulære områder. | Tunge |
| Lymfeknuder (distale fra indgangssted) | Spiserør (mindst 2 niveauer, herunder 1 længdesnit gennem carina og 1 tværsnit) |
| Brystkirtler (hundyr) | [Ureter] |
| Muskel (lår) | [Urethra] |
| Nasopharyngeale væv (mindst 4 niveauer; 1 niveau for at medtage nasopharyngeal-kanalen og NALT (Nasal Associated Lymphoid Tissue) | [Urinblære] |
| | **Uterus** |
| | Målorganer |
| | Alle større læsioner og masser |

▼M4

43. Lunger udtages hele og intakte, vejes og behandles med et passende fikseringsmiddel ved et tryk på 20-30 cm vand for at sikre, at lungestrukturen bevares (5). Snit udtages for alle lapper på et niveau, herunder hovedbronchier, men hvis der udføres lungeskylning, udtages en ikkeskyllet lap på tre niveauer (ikke serielle snit).

44. Mindst fire niveauer af nasopharyngealt væv undersøges, hvoraf det ene omfatter nasopharyngeal-kanalen (5) (6) (7) (8) (9), så der kan udføres en tilstrækkelig undersøgelse af pladeepitel, transitionelt epitel (respiratorisk uden cilier), respiratorisk epitel (respiratorisk med cilier) og lugteepitel samt drænende lymfevæv (NALT) (10) (11). Tre niveauer af larynx undersøges, og et af disse niveauer skal omfatte basis af strubelåget (12). Mindst to niveauer af luftrøret undersøges, herunder et længdesnit gennem carina i bifurkationen af de ekstrapulmonal bronchier og et tværsnit.

HISTOPATOLOGI

45. Der foretages en histopatologisk evaluering af alle organer og væv, der er anført i tabel 2, for kontrolgruppen og gruppen med den højeste højkoncentration og for alle dyr, der dør eller aflives under forsøget. Særligt luftvejene, målorganerne og større læsioner skal undersøges. Organer og væv med læsioner i gruppen med den højeste koncentration undersøges i alle grupper. Forsøgslederen kan vælge at udføre histopatologiske evalueringer for yderligere grupper for at påvise et klart forhold mellem koncentration og respons. Hvis der anvendes en satellitgruppe (reversibilitet), skal der på dyrene i denne gruppe udføres histopatologisk evaluering af væv og organer, på hvilke der var vist ændringer i behandlingsgruppen. Hvis der er usædvanligt mange dyr, der dør tidligt, eller andre problemer i højeksponeringsgruppen, som kompromitterer signifikansen af data, foretages en histopatologisk undersøgelse af den næste lavere koncentration. Makroskopiske observationer korreleres så vidt muligt med mikroskopiske fund.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

46. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt, foderindtagelse, klinisk patologi, makroskopisk patologi, organvægt og histopatologi. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund. Alle kvantitative og tilfældige resultater evalueres ved hjælp af en passende statistisk metode. Enhver generelt accepteret statistisk metode kan anvendes, og de statistiske metoder skal vælges under planlægningen af forsøget.

**Testrapport**

47. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

*Forsøgsdyr og pasning*

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

▼M4

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte kildedata og historiske data, hvis de vedrører dyr, der er eksponeret under lignende eksponerings-, bur- og fasteforhold

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

*Testkemikalie*

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

*Vehikel*

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

*Inhalationskammer*

— detaljeret beskrivelse af inhalationskammeret, herunder rumfang og et diagram

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— behandling af tilført/udledt luft

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret ($t_{95}$)

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

*Eksponeringsdata*

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

▼M4

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for blandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, $mg/m^3$ osv.) i stedet for volumenenheder (ppm, ppb osv.)

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

*Testbetingelser*

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet;

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til overvågning af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer (dvs. fastlæggelse af en kalibreringskurve)

— nærmere oplysninger om udstyr, der anvendes til at udtage prøver til bestemmelse af koncentration og partikelstørrelsesfordeling i kammer

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— randomiseringsmetode til tildeling af dyr til test- og kontrolgrupper

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

*Resultater*

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og $\sigma_g$

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed, tidspunkt for indtræden og varighed)

▼M4

— opstilling i tabelform af de enkelte dyrs vægt

— opstilling i tabelform af foderindtagelse

— opstilling i tabelform af kliniske patologiske data

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

*Diskussion og fortolkning af resultater*

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes.

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (3).

— Målorganet (-organerne) identificeres.

— NOAEL og LOAEL bestemmes.

*LITTERATUR:*

(1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No. 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE og Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. I: Waalkes MP og Ward JM (eds) Carcinogenesis. TARGET Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

B.30. **FORSØG VEDRØRENDE KRONISK TOKSICITET**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 452 (2009). Den oprindelige TG 452 blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.30 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og myndighedsbestemmelser (1) (2) (3) (4). Denne testmetode B.30 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier.

2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (5), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (6).

3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet. Langvarige forsøg vedrørende kronisk toksicitet, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (6) (7) og dermal applikation (6). Kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (7) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (10) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en betydelig del af de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, peger på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet

— identifikation af målorganer

— karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (6).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af de toksikologiske karakteristika for et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for kronisk toksicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, informationer om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til kroniske test som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (11) (12) (13) (14).

8. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (6) og Guidance Document No. 35 (15).

▼M4

9. Når et forsøg vedrørende kronisk toksicitet gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (16), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.

10. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (6) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (17) (18). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 11).

11. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (denne testmetode B.30) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 9 og 20-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.

12. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (6).

TESTENS PRINCIP

13. Testkemikaliet administreres dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 33). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Testkemikaliet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 19). I denne periode observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

14. Denne testmetode omhandler primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet hos gnavere (se afsnit 2), selv om det anerkendes, at lignende forsøg på ikke-gnavere kan være påkrævet i medfør af lovgivningen. Valget af dyreart skal begrundes. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (5). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

15. Den foretrukne art i denne testmetode er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Forsøget vedrørende kronisk toksicitet gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

**Opbevaring og fodringsbetingelser**

16. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

**Forberedelse af dyrene**

17. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for

▼M4

alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

**Dyrenes antal og køn**

18. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der ved afslutningen af forsøget er tilstrækkeligt mange dyr i hver gruppe til at foretage en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hvis der anvendes gnavere, skal der normalt anvendes mindst 20 dyr pr. køn pr. gruppe til hvert dosisniveau. Hvis der anvendes ikke-gnavere, anbefales mindst 4 dyr pr. køn pr. gruppe. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser.

**Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgrupper og sentineldyr**

19. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget (mindst 10 dyr/køn/gruppe), f.eks. ved 6 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af toksikologiske virkninger og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (22). Hvis aflivninger eller inklusion af satellit- eller sentinelgrupper planlægges undervejs i forsøget, skal antallet af dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Disse dyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

**Dosisgrupper og dosering**

20. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (6). Mindst tre dosisniveauer og en sideløbende kontrol bør anvendes, undtagen i tilfælde af en begrænset test (se afsnit 27). Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

▼M4

21. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges normalt det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 22, vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %).

22. Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt. Den højeste dosis bør ikke overstige 1 000 mg/kg kropsvægt/dag (grænsedosis, se afsnit 27).

23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.

24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

25. Som yderligere beskrevet i Guidance Document No. 116 (6) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.

▼M4

26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret foderindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

27. Hvis det ud fra informationer fra forforsøg kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag og de fremgangsmåder, der er beskrevet for dette forsøg, næppe vil fremkalde negative virkninger, og hvis toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier, kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

**Fremstilling af doser og administration af testkemikalie**

28. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (6). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

29. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

30. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

31. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (se også afsnit 33), men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene. Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (10), i en periode på 12 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (8).

32. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Det maksimale væskevolumen, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (22). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.

**Forsøgets varighed**

33. Denne testmetode er primært designet som et 12-måneders forsøg vedrørende kronisk toksicitet, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. 6 eller 9 måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering. Yderligere oplysninger, herunder overvejelser om overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (6).

OBSERVATIONER

34. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.

▼M4

35. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Undersøgelserne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (24).

36. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliet. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.

37. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (24) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (25), (26), (27), gribestyrke (28) og motorisk aktivitet (29) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

38. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

**Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse**

39. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

▼M4

**Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver**

40. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder), og de samme dyr anvendes i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 18). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.

41. Følgende parametre bør undersøges (30): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikaliet har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocyttællinger og knoglemarvcytologi også være indiceret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.

42. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser og med anvendelse af de samme dyr i hele forsøget. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. fire dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved 3 måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør faste inden blodprøvetagning. Følgende parametre bør undersøges (30): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, kalcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdesyrer) (31) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5′-nucleotidase, total bilirubin og totale galdesyrer) (31). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.

▼M4

43. Urinanalyser udføres på mindst 10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved 3 måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgik i en ekspertanbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (30): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

44. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (30). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 50) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

**Patologi**

*Makroskopisk obduktion*

45. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 19). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentineldyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.

46. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 45. Binyrer, hjerne, bitestikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejet efter fiksering, med paratyreoideae) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring. I forsøg med mus er vejningen af binyrer valgfri.

47. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 32) (væv i kantet parentes er valgfrit):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alle større læsioner | Hjerte | Bugspytkirtel | Mavesæk (formave, kirtelmave) |
| Binyrer | Ileum | Biskjoldbruskkirtel | [Tænder] |
| Aorta | Jejunum | Perifer nerve | Testikler |
| Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | Nyre | Hypofyse | Brisler |
| Cæcum | Tårekirtel (ekstraorbital) | Prostata | Skjoldbruskkirtel |
| Cervix | Lever | Rectum | [Tunge] |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Prostata anterior | Lunge | Spytkirtel | Luftrør |
| Tyktarm | Lymfeknuder (både overfladiske og dybe) | Vesiculae seminales | Urinblære |
| Duodenum | Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr) | Skeletmuskel | Uterus med cervix |
| Epididymis | [Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser] | Hud | [Ureter] |
| Øje (herunder retina) | Øsofagus | Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal) | [Urethra] |
| [Femur med led] | [Bulbus olfactorius] | Milt | Vagina |
| Galdeblære (for andre arter end rotte) | Æggestok | [Sternum] | Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat |
| Harderian-kirtel | | | |

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserveres, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

*Histopatologi*

48. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (32). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter

— målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

49. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

50. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør være indgivet fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme og være genereret inden for fem år forud for det aktuelle forsøg.

51. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 8). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

**Testrapport**

52. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

*For eventuelt vehikel:*

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

*For forsøgsdyrene:*

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, køn og alder ved forsøgets begyndelse

▼M4

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

*Testbetingelser:*

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

*Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):*

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt

— data vedrørende toksicitet sat over for køn og dosis, inklusive toksicitetstegnene

— art, incidens (og, hvis vurderet sværhedsgrad) og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— oftalmologisk undersøgelse

— hæmatologiske målinger

— klinisk-biokemiske målinger

— urinanalyser

— resultat af undersøgelser af neurotoksicitet eller immunotoksicitet

— kropsvægt ved forsøgets afslutning

— organvægt (og deres forhold, hvis relevant)

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund

— data for absorption, hvis de forefindes.

▼M4

*Evt. statistisk behandling af resultaterne*

*Diskussioner af resultater, herunder:*

— forhold mellem dosis og respons

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— diskussion af tilgange til modellering

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— historiske kontroldata

— relevans for mennesker.

*Konklusioner*

*LITTERATUR:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No.39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakaut toksicitet (inhalation), 28-dages forsøg.

(9) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg.

(10) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.31. **PRÆNATAL UDVIKLINGSTOKSICITETSUNDERSØGELSE**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG (2001).

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode til udviklingstoksicitetsundersøgelse er at skaffe generel information om virkningerne af prænatal eksponering på det drægtige forsøgsdyr og på organismen, mens den udvikles in utero; heri kan også indgå en vurdering af maternel påvirkning såvel som død, strukturabnormiteter og ændret vækst af fosteret. Skønt funktionelle mangler er en vigtig del af udviklingen, indgår de ikke i denne forsøgsmetode. Funktionelle mangler kan i stedet undersøges i et særskilt forsøg eller ved at denne undersøgelse suppleres med anvendelse af metoden til undersøgelse af udviklingsneurotoksicitet. Til undersøgelse for funktionelle mangler og andre postnatale effekter kan anvendes metoderne fra reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer og udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse.

Denne metode kan kræve individuel tilpasning på grundlag af konkret viden om f.eks. teststoffets fysisk-kemiske eller toksikologiske egenskaber. En sådan tilpasning kan godtages, når det på overbevisende måde videnskabeligt dokumenteres, at tilpasningen vil gøre forsøget mere informativt. I sådanne tilfælde skal denne videnskabelige dokumentation være nøje beskrevet i forsøgsrapporten.

1.2. DEFINITIONER

**Udviklingstoksikologi:** Undersøgelse af de ugunstige virkninger på organismens udvikling, som kan forårsages af eksposition før konceptionen, under den prænatale udvikling og posnatalt i tiden indtil kønsmodning. Hovedmanifestationerne af toksisk virkning på udviklingen er 1) organismens død, 2) strukturabnormiteter, 3) ændret vækst og 4) funktionelle mangler. Udviklingstoksikologi er tidligere hovedsagelig blevet betegnet teratologi.

**Negativ virkning:** Enhver sådan behandlingsrelateret afvigelse fra grundlinjen, som forringer en organismes overlevelsesevne, reproduktionsevne eller tilpasningsevne til omgivelserne. Udviklingstoksikologi omfatter i bredeste forstand enhver virkning, som interfererer med den normale udvikling af conceptus både før og efter fødslen.

***Ændret vækst:*** Ændring i afkommets organ- eller kropsvægt eller -størrelse.

**Forandringer (abnormiteter):** Strukturelle forandringer i udviklingen, herunder både misdannelser og afvigelser (28).

**Misdannelse/væsentlig abnormitet:** Strukturforandring, som anses for skadelig for dyret (og kan være dødelig), og som sædvanligvis er sjælden.

▼B

**Afvigelse/mindre abnormitet:** Strukturændring, som anses for at have ingen eller ringe skadelig virkning for dyret; kan være forbigående og kan optræde forholdsvis hyppigt i kontrolpopulationen.

**Conceptus:** Det samlede produkt af et befrugtet æg på ethvert stadium af udviklingen fra befrugtning til fødsel, herunder ekstraembryonale membraner samt selve embryo eller føtus.

**Implantation (nidation):** Fasthæftning af blastocysten til det indvendige epitel i uterus, herunder penetration af uterusepitelet og indlejring i endometriet.

**Embryo:** Organismens tidlige stadium eller udviklingsstadium, specielt det fremvoksende produkt af æggets befrugtning, efter at længdeaksen viser sig, og indtil alle hovedstrukturer er til stede.

**Embryotoksisk:** Skadelig for den normale struktur, udvikling, vækst og eller levedygtighed af et embryo.

**Føtus:** Det ufødte afkom i den postembryonale periode.

**Føtotoksicitet:** Skadevirkning på den normale struktur, udvikling, vækst og eller levedygtighed af et føtus.

**Abort:** Præmatur udstødelse fra uterus af konceptionsprodukter, dvs. af embryonet eller af et ikke levedygtigt føtus.

**Resorption:** Et conceptus, som efter at have være implanteret i uterus er dødt og er ved at blive resorberet eller er blevet det.

**Tidlig resorption:** Tegn på implantation uden genkendeligt embryo/føtus.

**Sen resorption:** Et dødt embryo eller føtus med ydre degenerative forandringer.

**NOAEL:** forkortelse for »no-observed-adverse-effect level«, dvs, den højeste dosis eller det højeste eksponeringsniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede negative virkninger.

1.3. REFERENCESTOF

Intet.

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Teststoffet administreres normalt til drægtige dyr, i det mindste fra implantationsdagen til én dag før planlagt aflivning, som bør finde sted så kort som muligt før det forventede fødselstidspunkt, uden at der er risiko for tab af data som følge af for tidlig fødsel. Det er ikke hensigten, at metoden alene skal omhandle organogeneseperioden (f.eks. dag 5-15 hos gnavere og dag 6-18 hos kaniner), men, når det er hensigtsmæssigt, også virkninger fra præimplantationsperioden gennem hele drægtighedsperioden indtil dagen før kejsersnit. Kort inden kejsersnittet aflives hundyrene, uterusindholdet undersøges, og føtus bedømmes for synlige udvendige abnormiteter og bløddels- og skeletforandringer.

▼B

1.5. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.5.1. **Valg af dyreart**

Det anbefales, at forsøget udføres i den mest relevante dyreart, og at de anvendte laboratoriedyr er af arter og stammer, som sædvanligvis benyttes til teratogenicitetsforsøg. Den foretrukne art gnavere er rotter, og den foretrukne art ikke-gnavere er kaniner. Anvendes andre dyrearter, bør dette begrundes.

1.5.2. **Omgivende miljø og fodring af dyrene**

Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 ºC (± 3 ºC) for gnavere og 18 ºC (± 3 ºC) for kaniner, Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % undtagen under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand,

Parring bør finde sted i bure egnede til formålet. Par bør fortrinsvis holdes for sig, men gruppevis anbringelse af få dyr kan også godtages.

1.5.3. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst fem døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og/eller alder. Dyrene i alle forsøgsgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder, På hvert dosisniveau skal anvendes unge voksne hundyr, som ikke tidligere har født. Hunnerne parres med hanner af samme art og stamme, idet parring af søskendedyr undgås. For gnavere er drægtighedsperiodens dag 0 den dag, hvor der observeres en vaginal prop og/eller semen; for kaniner er dag 0 sædvanligvis dagen for coitus eller for kunstig insemination, hvis denne teknik anvendes. De parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgruppeme. Burene arrangeres således, at eventuelle virkninger af burenes placering minimeres. Hvert dyr tilordnes et unikt identifikationsnummer. Parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne, og hvis hunnerne parres holdvis, skal dyrene i hvert hold fordeles ligeligt mellem grupperne. Tilsvarende skal hunner, som insemineres af samme han, fordeles jævnt mellem grupperne.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Dyrenes antal og køn**

I hver behandlings- og kontrolgruppe skal der være tilstrækkeligt med hunner til, at der ved obduktion fås ca. 20 hundyr med implantationssteder. Hvis der færre end 16 dyr med implantationssteder i en gruppe, kan det blive anset for utilstrækkeligt. Mortalitet af moderdyrene gør ikke nødvendigvis undersøgelsens resultater ugyldige, forudsat at den ikke er over ca. 10 %.

▼B

1.6.2. **Tilberedning af doser**

Anvendes et vehikel eller andet tilsætningsstof, skal følgende egenskaber tages i betragtning: Indvirkningen på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention eller udskillelse; eventuel sådan indvirkning på teststoffets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske egenskaber, samt indvirkningen på dyrenes føde- og vandindtagelse eller ernæringstilstand, Vehiklet må hverken være udviklingstoksisk eller påvirke reproduktionen.

1.6.3. **Dosering**

Normalt administreres teststoffet dagligt fra implantationstidspunktet (f.eks. dag 5 efter parring) til dagen inden det planlagte kejsersnit. Hvis eventuelle indledende undersøgelser ikke tyder på et stort potentiale for præimplantationstab, kan behandlingen udvides til at omfatte hele drægtighedsperioden fra parringen til dagen før den planlagte aflivning. Det er velkendt, at uhensigtsmæssig behandling eller stress i drægtighedsperioden kan medføre prænatalt tab. For at sikre mod prænatalt tab som følge af ikke-behandlingsrelaterede faktorer skal man undgå unødvendig håndtering af drægtige dyr samt stress forårsaget af ydre faktorer som støj.

Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Raske dyr skal fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne. Dosisniveauerne bør vælges med sådanne intervaller, at der frembringes en gradueret toksisk effekt. Medmindre doseringen må begrænses pga. teststoffets fysisk-kemiske eller biologiske egenskaber, vælges den højeste dosering således, at den har en vis udviklingstoksisk effekt og/eller toksisk effekt på moderdyret (kliniske symptomer eller vægttab), men uden at den forårsager død eller alvorlige lidelser. Der skal være mindst ét mellemniveau, som fremkalder det laveste observerbare niveau af toksisk effekt. Den laveste dosering må hverken medføre tegn på materiel toksicitet eller udviklingstoksicitet. Der vælges en aftagende række dosisniveauer. som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons samt det niveau, som ikke medfører tegn på skadelig effekt (NOAEL). Ved fastlæggelse af den aftagende række dosisniveauer svarer de optimale intervaller ofte til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. Skønt målet er at fastlægge en maternel NOAEL, kan undersøgelser, hvor en sådan dosis ikke fastlægges, også være acceptable (1).

Doseringen vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitetsdata samt supplerende oplysninger om metabolisme og toksikokinetik af teststof eller beslægtede stoffer. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre det hensigtsmæssige i den valgte dosering.

Der skal være en sideløbende kontrolgruppe. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af teststoffet. Alle grupper skal modtage samme volumen af enten teststof eller bærestof. Dyrene i kontrolgruppen (-grupperne) skal håndteres på samme måde som behandlingsgruppen. Kontrolgrupper på vehikel skal modtage dette i den største mængde, det anvendes i (som til behandlingsgruppen på laveste dosis).

▼B

1.6.4. **Grænseprøve**

Såfremt et oralt testdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/-døgn med de til dette forsøg beskrevne metoder ikke frembringer observerbar toksisk virkning i de drægtige dyr eller deres afkom, og såfremt foreliggende data (f.eks. fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser) ikke giver anledning til at forvente nogen virkning, skal et komplet forsøg med tre dosisniveauer ikke absolut anses for nødvendigt. Den påregnede eksponering af mennesker kan tilsige, at der anvendes et højere oralt dosisniveau end det. der er anvendt i grænseforsøget. For andre administrationsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for og begrænse det maksimale opnåelige ekspositionsniveau (f.eks. må dermal applikation ikke forårsage alvorlige lokale toksiske virkninger).

1.6.5 **Administration af doser**

Teststoffet administreres sædvanligvis oralt med sonde. Anvendes anden administrationsvej, skal forsøgslederen begrunde valget, og passende modifikationer kan være nødvendige (2)(3)(4). Teststoffet bør administreres på omtrent samme tidspunkt hver dag.

Doseringen til det enkelte dyr bør normalt baseres på den seneste bestemmelse af dyrets vægt. I drægtighedsperiodens sidste trimester må justering af doseringen dog ske med varsomhed. Doseringen bør på grundlag af foreliggende data vælges, så man undgår kraftig maternel toksicitet, Konstateres der kraftig toksisk effekt i de behandlede moderdyr, skal disse aflives af humane grunde. Viser flere drægtige dyr tegn på stærk toksicitet, bør man overvejs at indstille forsøget for den pågældende dosisgruppe. Administreres stoffet med sonde, bør dette fortrinsvis ske som enkeltdosis ved hjælp af gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt, bortset fra vandige opløsninger, af hvilke der kan anvendes 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendes majsolie som vehikel, må volumenet ikke overstige 0,4 ml/100 g kropsvægt. Variationer i testvolumen skal ved justering af koncentrationerne minimeres, så der sikres et konstant volumen for alle dosisgrupper.

1.6.6. **Iagttagelse af moderdyrene**

Klinisk observation skal foretages og registreres mindst én gang dagligt, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag, idet man retter sig efter tidspunktet for den forventede maksimale effekt af indgivelsen. Dyrenes tilstand registreres, herunder dødelighed, moribund tilstand, væsentlige adfærdsændringer og alle tegn på åbenbar toksicitet.

1.6.7. **Kropsvægt og fødeindtagelse**

Dyrene vejes på drægtighedsperiodens dag 0 eller, for tidsparrede dyr leveret fra en ekstern opdrætter, på den første dag i doseringsperioden, og derefter mindst hver tredje dag i doseringsperioden samt på dagen for den planlagte aflivning.

▼B

Fødeindtagelsen registreres med tre dages mellemrum, hvilket skal falde sammen med kropsvægtbestemmelsen.

1.6.8. **Post-mortem undersøgelse**

Hunnerne aflives ét døgn for den forventede fødsel. Hunner, som inden den planlagte aflivning viser tegn på abort eller for tidlig fødsel, aflives og underkastes grundig makroskopisk undersøgelse.

Ved forsøgets slutning eller ved indtræden af død under forsøget undersøges moderdyret makroskopisk for eventuelle strukturabnormiteter eller patologiske forandringer. Vurderingen af hundyrene under kejsersnittet og de efterfølgende undersøgelser af føtus bør fortrinsvis ske uden kendskab til behandlingsgruppen for at minimere skævhed.

1.6.9. **Undersøgelse af uterusindholdet**

Umiddelbart efter undersøgelsens afslutning eller snarest muligt efter dødens indtræden udtages uterus, og dyrenes drægtighedsstatus fastslås. Uteri, som fremtræder ikke-gravide, undersøges nærmere (f.eks. med ammoniumsulfidfarvning til gnavere og Salewski-farvning som en velegnet alternativ metode til kaniner) med henblik på bekræftelse af den ikke-gravide status (5).

De gravide uteri inklusive cervix vejes. Vægten af den gravide uterus skal ikke bestemmes for dyr, som findes døde i løbet af undersøgelsen.

Antal corpora lutea hos drægtige dyr bestemmes.

Uterusindholdet undersøges for antal døde embryoner eller føtus samt levende fostre, Resorptionsgraden beskrives, for at det relative dødstidpunkt for conceptus skønsvis kan fastsættes (se punkt 1.2).

1.6.10. **Undersøgelse af føtus**

For hvert føtus bestemmes køn og kropsvægt.

Hvert føtus undersøges for ydre forandringer (6).

Føtus undersøges for skelet- og bløddelsforandringer (f.eks. variationer, misdannelser og abnormiteter) (7)(8)(9)(10)(11)(12)-(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). Det må foretrækkes, at føtale forandringer kategoriseres, men dette er ikke et krav. Har kategorisering fundet sted, skal det klart angives, efter hvilke kriterier hver kategori er fastlagt. Særlig opmærksomhed skal udvises over for reproduktionssystemet, som skal undersøges for tegn på forandringer i udviklingen.

For gnavere skal ca, halvdelen af hvert kuld præpareres og undersøges for skeletforandringer. Den resterende del præpareres og undersøges for bløddelsforandringer med anerkendte eller egnede metoder til seriesnit eller omhyggelig makroskopisk dissektion.

▼B

For ikke-gnavere, f.eks. kaniner, skal alle fostre undersøges for både bløddels- og skeletforandringer. Disse fostre vurderes for bløddelsforandringer ved omhyggelig dissektion. herunder også metoder til nærmere vurdering af hjertets indvendige struktur (25). Hovedet på halvdelen af de således undersøgte fostre fjernes og præpareres til undersøgelse af bløddelsforandringer (herunder øjne, hjerne, næsesvælg og tunge), idet der anvendes sædvanlige seriesnitmetoder (26) eller en metode med tilsvarende følsomhed. Kroppen af disse fostre og de resterende intakte fostre behandles og undersøges for skeletforandringer med anvendelse af de samme metoder som beskrevet for gnavere.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data rapporteres for hver enkelt moderdyr og dets afkom og sammenfattes i tabelform med angivelse, for hver forsøgsgruppe, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle toksiske virkninger, arten af de fund, der er gjort på embryo/føtus, samt alle relevante data vedrørende afkommet.

Talresultaterne evalueres med en passende statistisk metode, hvor kuldet benyttes som enhed for dataanalysen, Der anvendes en almindelig anerkendt statistisk metode; valg af statistiske metoder skal indgå som en del af undersøgelsens design og skal begrundes. Data fra dyr, som ikke overlever indtil den planlagte aflivning, skal ligeledes rapporteres. Disse data kan, når det er relevant, indgå i gruppegennemsnittet. Relevansen af data for sådanne dyr og dermed om de skal indgå i et gruppegennemsnit eller ikke, skal begrundes og vurderes på individuel basis.

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Fundene i den prænatale udviklingstoksikologiske undersøgelse skal vurderes med hensyn til de iagttagne effekter. I vurderingen skal indgå følgende oplysninger:

— maternelle og embryonale/føtale testresultater, herunder vurdering af sammenhæng, eller mangel herpå, mellem dyrenes udsættelse for teststoffet og forekomst og sværhedsgrad af alle fund

— de anvendte kriterier for inddeling af føtale eksterne, bløddels- og skeletforandringer, såfremt inddeling er foretaget

▼B

— når det er hensigtsmæssigt, historiske kontroldata, som kan være nyttige ved tolkning af undersøgelsesresultaterne

— de tal, der ligger til grund for beregning af alle procenttal og indekser

— når det er hensigtsmæssigt, fyldestgørende statistisk analyse af undersøgelsesresultaterne, med tilstrækkelige oplysninger om analysemetoden til, at en uafhængig rapportør/statistiker kan revurdere og eftergøre analysen.

I enhver undersøgelse, som viser fravær af toksiske virkninger, skal nødvendigheden af supplerende undersøgelser til bestemmelse af teststoffets absorption og biotilgængelighed diskuteres.

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

En prænatal udviklingstoksicitetsundenøgelse giver oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et stof på moderdyrene og på den intrauterine udvikling af afkommet. Undersøgelsens resultater skal fortolkes i sammenhæng med fundene fra subkroniske, reproduktions-, toksikokinetiske og andre undersøgelser. Da der lægges vægt både på almen toksisk respons i form af maternel toksicitet og på udviklingstoksikologiske endpoints, vil undersøgelsens resultater i nogen grad gøre det muligt at skelne mellem de udviklingsmæssige effekter, som ikke er ledsaget af en almen toksisk virkning, og dem, som kun påføres på niveauer, som også er toksiske for moderdyret (27).

## 3. RAPPORTERING

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende specifikke oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikation, herunder CAS-nummer, hvis dette kendes/findes

— renhed.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art og stamme

— antal dyr og deres alder

— oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

For forsøgsbetingelserne:

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om vedrørende formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

▼B

— oplysninger om administration af teststoffet

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— miljøbetingelser

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater:

Data vedrørende materiel toksisk respons for hver dosisgruppe, inklusive, men ikke begrænset til:

— antal dyr som indgår ved forsøgets start, antal overlevende dyr, antal drægtige, antal aborterende, antal dyr, som føder for tidligt

— dato for dødens indtræden under forsøget eller hvorvidt dyrene overlevede til slutningen

— data fra dyr, som ikke overlever indtil den planlagte aflivning, skal rapporteres, men skal ikke indgå i den statistiske gruppe-sammenligning

— dag for iagttagelse af hvert abnormt klinisk symptom og dets efterfølgende forløb

— kropsvægt. kropsvægtændring og vægten af den gravide uterus, herunder kropsvægtændring korrigeret for vægten af den gravide uterus (ikke obligatorisk)

— fødeindtagelse og (hvis den måles) vandindtagelse

— obduktionsfund, herunder vægt af uterus

— NOAEL-niveau for maternel og udviklingsmæssig effekt skal rapporteres.

Udviklingsmæssige endpoints for kuld med implantater, herunder:

— antal corpora lutea

— antal implantationer, antal og procentdel levende og døde fostre og resorptioner

— antal og procentdel præ- og postimplantationstab.

Udviklingsmæssige endpoints for kuld med levende fostre, herunder:

— antal og procentdel levende afkom

— kønsfordeling

— føtal kropsvægt, helst for hvert køn og for begge køn samlet

— udvendige, bløddels- og skeletmisdannelser og andre relevante forandringer

— eventuelle inddelingskriterier

▼B

— samlet antal og procentdel fostre og kuld med ydre, bløddels- eller skeletforandringer, samt type og incidens af enkeltabnormiteter og andre relevante forandringer.

Diskussion af resultaterne.

Konklusioner.

4. **HENVISNINGER**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Inf luence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Analysis 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicologv 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Speciflc Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Färbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimenielle Pathologie 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Ditferential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Cengenital Anomalies 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32; :381-391.

(9) Kimmel. C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology 9; :398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology 8: 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology 46: 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Slam Technology 39; 61-63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, II.

(22) Wilson. J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity, Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, F.B. and CG. Bennett (1977) A Dissseting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, II, pp, 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment, Federal Register 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

## B.32. **KARCINOGENICITETSFORSØG**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 451 (2009). Den oprindelige TG 451 vedrørende karcinogenicitetsforsøg blev vedtaget i 1981. Denne reviderede testmetode B.32 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (2) (3) (4) (5) (6). Denne testmetode B.32 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) og kapitel B.33 i dette bilag (Kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode B.32 er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. De fleste karcinogenicitetsforsøg gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere, med de nødvendige ændringer. Yderligere vejledning findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

3. De tre primære administrationsveje i karcinogenicitetsforsøg er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i karcinogenicitetsforsøg. Karcinogenicitetsforsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af dermal applikation (7) og inhalation (7) (8). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Karcinogenicitetsforsøget skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan vare de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper

— identifikation af målorganer for karcinogenicitet

— identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer

— karakterisering af forholdet mellem dosis-respons og tumor

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for karcinogenicitet, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliet er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).

8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg med gentagen eksponering. Vurderingen af karcinogenicitet bør udføres, når indledende informationer om toksicitet er

▼M4

indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering-/fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsesvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).

10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis«.

11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant, hvis der gennemføres et kombineret forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) (afsnit 12).

12. Det bør overvejes at udføre et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag) i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (denne testmetode B.32). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-25) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet (kapitel B.33 i dette bilag), og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser.

▼M4

13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Testkemikaliet administreres normalt oralt dagligt i forskellige doser til forskellige grupper af forsøgsdyr i størstedelen af deres levetid. Test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. Dyrene observeres nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Karcinogenicitetsforsøget bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelsesfrekvens, til det langvarige forsøg. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

**Opbevaring og fodring**

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester,

▼M4

persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

**Forberedelse af dyrene**

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af det anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

**Dyrenes antal og køn**

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. Hver dosisgruppe og samtidig kontrolgruppe skal derfor bestå af mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimater forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønnedet karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

**Reserve til aflivninger under forsøget og satellitgrupper (sentineldyr)**

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved 12 måneder, for at fremskaffe oplysninger om progression af neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. Hvis aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som planlægges aflivet under forsøget, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk 5 dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Nærmere detaljer findes i Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

**Dosisgrupper og dosering**

21. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

22. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Under hensyntagen til de faktorer, der er anført i afsnit 23, vælges normalt det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en *negativ virkning,* som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.

23. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliets virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 25) på det laveste dosisniveau. Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes.

24. Det valgte dosisinterval afhænger af testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

25. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

▼M4

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker.

26. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt dosisgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

**Fremstilling af doser og administration af testkemikalie**

27. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

28. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie) og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

29. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

30. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (7 dage om ugen) normalt i en periode på 24 måneder (se også afsnit 32). Ethvert andet dosisregime, f.eks. fem gange ugentlig, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 24 måneder. Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 24 måneder. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).

31. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen bør undgås.

**Forsøgets varighed**

32. Varigheden af forsøget er normalt 24 måneder for gnavere, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

— Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosisgrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.

— Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.

— Overlevelse vurderes separat for hvert køn.

— Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

▼**M4**

OBSERVATIONER

33. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans, idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.

*Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse*

34. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

*Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser*

35. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis det vurderes at være relevant, kan blodprøver udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser udtagning og urinanalyse som en del af aflivningen under forsøget (afsnit 20) og ved forsøgsafslutning på mindst 10 dyr pr. køn pr. gruppe. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse og opbevares under hensigtsmæssige forhold. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i forbindelse med vurderingen af karcinogent/onkogent potentiale (32).

PATOLOGI

*Makroskopisk obduktion*

36. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.

▼**M4**

37. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 33) (væv i kantet parentes er valgfrit):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alle større læsioner | Hjerte | Bugspytkirtel | Mavesæk (formave, kirtelmave) |
| Binyrer | Ileum | Biskjoldbruskkirtel | [Tænder] |
| Aorta | Jejunum | Perifer nerve | Testikler |
| Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | Nyre | Hypofyse | Brisler |
| Cæcum | Tårekirtel (ekstraorbital) | Prostata | Skjoldbruskkirtel |
| Cervix | Lever | Rectum | [Tunge] |
| Prostata anterior | Lunge | Spytkirtel | Luftrør |
| Tyktarm | Lymfeknuder (både overfladiske og dybe) | Vesiculae seminales | Urinblære |
| Duodenum | Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr) | Skeletmuskel | Uterus med cervix |
| Epididymis | [Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser] | Hud | [Ureter] |
| Øje (herunder retina) | Øsofagus | Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal) | [Urethra] |
| [Femur med led] | [Bulbus olfactorius] | Milt | Vagina |
| Galdeblære (for andre arter end rotte) | Æggestok | [Sternum] | Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat |
| Harderian-kirtel | | | |

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer til præservation ved oral administration, præserveres, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 og B.29 i dette bilag. For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

▼**M4**

*Histopatologi*

38. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (33). Følgende væv skal som minimum undersøges:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer

— når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

39. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

40. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.

41. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

**Testrapport**

42. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

▼M4

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

*For eventuelt vehikel:*

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

*For forsøgsdyrene:*

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

*Testbetingelser:*

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

*Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform)*

*Generelt*

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, evt. beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand (hvis relevant)

— toksikokinetiske data (hvis de forefindes)

— oftalmoskopi (hvis tilgængelig)

— hæmatologi (hvis tilgængelig)

— klinisk kemi (hvis tilgængelig).

▼M4

*Kliniske fund*

— tegn på toksicitet

— incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

*Obduktionsdata*

— kropsvægt ved forsøgets slutning

— organvægt og deres forhold, hvis relevant

— obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

*Histopatologi*

— ikkeneoplastiske histopatologiske fund

— neoplastiske histopatologiske fund

— korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund

— detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader

— rapport om peer review af objektglas.

*Evt. statistisk behandling af resultaterne*

*Diskussioner af resultater, herunder:*

— diskussion af tilgange til modellering

— dosis-responsforhold

— historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

*Konklusioner*

*LITTERATUR:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.8 i dette bilag, Subakut toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg

(10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg

(11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE og Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN og Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA og Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. I D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, et al. (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

B.33. **KOMBINERET FORSØG VEDRØRENDE KARCINOGENICITET/ KRONISK TOKSICITET**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 453 (2009). Den oprindelige TG 453 blev vedtaget i 1981. Denne opdaterede testmetode B.33 blev udviklet for at tage højde for den seneste udvikling på området for dyrevelfærd og lovgivningskrav (1) (2) (3) (4) (5). Denne testmetode B.33 er opdateret parallelt med revisionen af kapitel B.32 i dette bilag (Karcinogenicitetsforsøg) og kapitel B.30 i dette bilag (Forsøg vedrørende kronisk toksicitet) med det formål at fremskaffe yderligere oplysninger fra de dyr, der bruges i forsøget, og flere oplysninger om dosisvalg. Denne testmetode er designet, så den kan bruges til test af en bred vifte af kemikalier, herunder pesticider og industrikemikalier. Det skal dog bemærkes, at andre oplysninger og krav kan være gældende for lægemidler (se International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. De fleste forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet gennemføres ved hjælp af gnaverarter, og det er derfor hensigten, at denne testmetode primært anvendes i forsøg på sådanne arter. Hvis sådanne forsøg er nødvendige på ikke-gnavere, kan testmetodens principper og fremgangsmåder anvendes sammen med de principper og fremgangsmåder, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6), med de nødvendige ændringer som beskrevet i OECD Guidance Document No. 116 (7).

3. De tre primære administrationsveje i forsøg vedrørende kronisk toksicitet/ karcinogenicitet er oral indgift, dermal applikation og inhalation. Valget af administrationsvej afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Yderligere oplysninger om valg af administrationsvej findes i Guidance Document No. 116 (7).

4. Denne testmetode fokuserer på oral eksponering, den administrationsvej, der oftest bruges i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet. Langvarige forsøg, der involverer eksponering via inhalation eller dermal applikation, kan også være nødvendige i forbindelse med vurdering af risici for menneskers sundhed og/eller påkrævet i medfør af lovgivningen, men betydelig teknisk kompleksitet er forbundet med begge eksponeringsveje. Sådanne forsøg skal designes i hvert enkelt tilfælde, selv om den testmetode, der er beskrevet her til vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet ved oral administration, kan bruges som udgangspunkt for en protokol for inhalationsforsøg og/eller dermale forsøg, hvad angår anbefalinger vedrørende behandlingsperioder, kliniske og patologiske parametre osv. Der findes OECD-vejledninger om administration af testkemikalier ved hjælp af inhalation (7) (8) og dermal applikation (7). Kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10) bør sammen med OECD Guidance Document on Acute Inhalation Testing (8) specifikt anvendes ved design af forsøg med længere varighed, der involverer eksponering via inhalation. Kapitel B.9 i dette bilag (11) anvendes, hvis forsøget vedrører dermal applikation.

▼M4

5. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet skaffer viden om mulige sundhedsfarer, som kan opstå ved gentagen eksponering i løbet af en periode, der kan vare de anvendte arters levetid. Forsøget tilvejebringer oplysninger om de toksiske virkninger af testkemikaliet, herunder potentiel karcinogenicitet, og kan pege på, hvilke organer der rammes, og muligheden for akkumulation. Det kan også give et estimat af niveauet uden observerbare negative effekter (NOAEL) og, i tilfælde af ikke-genotoksiske karcinogener, af tumorrespons, som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for menneskers eksponering. Nødvendigheden af omhyggelig klinisk observation af dyrene for at opnå størst mulig viden bliver ligeledes understreget.

6. De forsøgsformål, der er omfattet af denne testmetode, omfatter:

— identifikation af et testkemikalies karcinogene egenskaber, der fører til en øget incidens af neoplasmer, øget andel af ondartede neoplasmer eller en reduktion i tiden til forekomsten af neoplasmer sammenlignet med samtidige kontrolgrupper

— identifikation af tid til fremkomst af neoplasmer

— identifikation af et testkemikalies kroniske toksicitet

— identifikation af målorganer for kronisk toksicitet og karcinogenicitet

— karakterisering af forholdet mellem dosis og virkning

— identifikation af NOAEL eller udgangspunkt for fastlæggelse af benchmark-dosis (BMD)

— ekstrapolering af karcinogene virkninger til eksponeringsniveauer for mennesker ved lav dosis

— forudsigelse af kroniske toksicitetsvirkninger på niveauer for menneskelig eksponering

— data til testhypoteser vedrørende virkningsmåde (2) (7) (12) (13) (14) (15).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Ved vurderingen og evalueringen af den potentielle karcinogenicitet og kroniske toksicitet af et testkemikalie inddrages alle tilgængelige informationer om testkemikaliet af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget, således at forsøget fokuseres på effektiv test af potentialet for dets toksikologiske egenskaber, og således at omfanget af dyreforsøg minimeres. Information om og overvejelse af virkningsmåden for et mistænkt karcinogen (2) (7) (12) (13) (14) (15) er særlig vigtig, fordi det optimale design kan variere, afhængigt af om testkemikaliet er et kendt eller mistænkt genotoksisk karcinogen. Yderligere vejledning om overvejelser vedrørende virkningsmåde findes i Guidance Document No. 116 (7).

8. Informationer, der kan hjælpe med at fastlægge forsøgsdesignet, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, evt. oplysninger om virkningsmåde, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, herunder genotoksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data, data om mutagenicitet/genotoksicitet og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede kemikalier, tilgængelige toksikokinetiske data (kinetiske data ved enkelt og gentagen eksponering) samt data udledt af andre forsøg

▼M4

med gentagen eksponering. Bestemmelsen af kronisk toksicitet/karcinogenicitet bør kun udføres, når indledende informationer om toksicitet er indhentet fra 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering. Kortvarige test med cancerinitiering-/fremme kan også give nyttige oplysninger. Det bør overvejes at benytte en faseinddelt testtilgang til karcinogenicitetstest som et led i den overordnede vurdering af de potentielle sundhedsskadelige virkninger af et bestemt testkemikalie (16) (17) (18) (19).

9. De statistiske metoder, der i betragtning af forsøgsdesignet og -formålene er mest relevante til analyse af resultater, fastlægges, inden forsøget påbegyndes. Det skal bl.a. overvejes, om statistikkerne skal omfatte justering for overlevelse, analyse af kumulative tumorrisici i forhold til overlevelsesvarighed, analyse af tid til tumor og analyse i tilfælde af afslutning af en eller flere grupper før tid. Vejledning om relevante statistiske analyser og nøglereferencer til internationalt anerkendte statistiske metoder findes i Guidance Document No. 116 (7) og Guidance Document No. 35 (20).

10. Når et karcinogenicitetsforsøg gennemføres, skal de vejledende principper og overvejelser, der er beskrevet i OECD Guidance Document No. 19 (21), navnlig afsnit 62, altid følges. I det afsnit anføres følgende: »I forsøg, der omfatter gentagen dosering, hvor et dyr udviser kliniske tegn, som er progressive og fører til yderligere forværring, træffes der en informeret beslutning om, hvorvidt dyret skal aflives. Beslutningen bør baseres på en overvejelse af værdien af de oplysninger, der kan indhentes, hvis dyret beholdes i forsøget, i forhold til dets generelle tilstand. Hvis det besluttes at beholde dyret i forsøget, øges frekvensen af observationer efter behov. Uden at påvirke testens formål kan det også være muligt midlertidigt at stoppe doseringen, hvis det letter dyrets smerte eller lidelse, eller at reducere testdosis.«

11. Detaljeret vejledning om og diskussion af principperne for dosisvalg i forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet findes i Guidance Document No. 116 (7) og to publikationer fra International Life Sciences Institute (22) (23). Den centrale strategi for dosisvalg afhænger af forsøgets primære mål (afsnit 6). Ved valg af hensigtsmæssige dosisniveauer skal der sikres en balance mellem på den ene side farescreening og på den anden side karakterisering af lavdosisrespons og deres relevans. Dette er især relevant i forbindelse med dette kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet.

12. Det bør overvejes at udføre dette kombinerede forsøg vedrørende kronisk toksicitet og karcinogenicitet i stedet for at udføre et separat forsøg vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag) og et separat karcinogenicitetsforsøg (kapitel B.32 i dette bilag). Den kombinerede test sparer både tid og omkostninger og reducerer i et vist omfang det nødvendige antal forsøgsdyr i forhold til gennemførelsen af to separate forsøg, uden at det kompromitterer kvaliteten af data i den kroniske fase eller fasen vedrørende karcinogenicitet. Principperne for dosisvalg (afsnit 11 og 22-26) bør dog overvejes nøje ved gennemførelsen af et kombineret forsøg vedrørende både kronisk toksicitet og karcinogenicitet, og det anerkendes også, at separate forsøg kan være nødvendige for at overholde visse lovgivningsbestemmelser. Yderligere vejledning om designet af det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet for at opnå maksimal effekt af forsøget med hensyn til muligheder for at reducere det anvendte antal forsøgsdyr og strømline de forskellige testprocedurer findes i Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

13. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i slutningen af dette kapitel og i Guidance Document No. 116 (7).

TESTENS PRINCIP

14. Forsøgsdesignet omfatter to parallelle faser, en kronisk fase og en karcinogenicitetsfase (se henholdsvis afsnit 34 og 35 for oplysninger om varighed). Testkemikaliet administreres normalt oralt, selv om test ved inhalation eller dermal applikation også kan anvendes. I forbindelse med den kroniske fase administreres testkemikaliet dagligt i graduerede doser til flere grupper af forsøgsdyr, normalt i en periode på 12 måneder, men der kan vælges kortere eller længere varigheder afhængigt af lovgivningskravene (se afsnit 34). Den valgte varighed skal være så lang, at virkninger af kumulativ toksicitet kan manifestere sig, uden at det konfunderer virkningerne af geriatriske forandringer. Forsøgsdesignet kan også omfatte en eller flere aflivninger i løbet af forsøget, f.eks. ved tre og seks måneder, og yderligere dyr kan inkluderes for at tage højde for dette (se afsnit 20). I forbindelse med karcinogenicitetsfasen administreres testkemikaliet dagligt til flere grupper af forsøgsdyr i størstedelen af dyrenes levetid. I begge faser observeres dyrene nøje for tegn på toksicitet og for udvikling af neoplastiske læsioner. Dyr, der dør eller aflives under forsøget, obduceres, og de overlevende dyr aflives og obduceres ved forsøgets afslutning.

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

15. Denne testmetode omfatter primært vurdering og evaluering af kronisk toksicitet og karcinogenicitet hos gnavere (afsnit 2). Brugen af ikke-gnavere kan overvejes, hvis de tilgængelige data viser, at de er mere relevante for forudsigelsen af sundhedsvirkningerne hos mennesker. Valget af dyreart skal begrundes. Den foretrukne gnaverart er rotten, men andre gnaverarter, f.eks. mus, kan anvendes. Selv om anvendelsen af mus i karcinogenicitetstest oftest er af begrænset nytte (24) (25) (26), kræves forsøg på mus stadig i henhold til visse lovgivningsbestemmelser, medmindre det påvises, at et sådant forsøg ikke er videnskabeligt nødvendigt. Rotter og mus er de foretrukne forsøgsmodeller på grund af deres relativt korte levetid, deres udbredte anvendelse i farmakologiske og toksikologiske forsøg, deres modtagelighed for tumorinduktion og tilgængeligheden af tilstrækkeligt karakteriserede stammer. Som følge af disse karakteristika findes der en stor mængde data om deres fysiologi og patologi. Design og gennemførelse af forsøg vedrørende kronisk toksicitet/karcinogenicitet på ikke-gnavere skal baseres på de principper, der er beskrevet i denne testmetode, og de principper, der er beskrevet i kapitel B.27 i dette bilag (Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere (6). Yderligere oplysninger om valg af dyreart og -stamme findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

16. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Det kombinerede forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet bør gennemføres på dyr af samme stamme og herkomst som de dyr, der blev anvendt i forforsøgene vedrørende toksicitet af kortere varighed. Hvis det vides, at dyr af denne stamme og herkomst giver problemer med at opfylde de accepterede kriterier for overlevelse i langvarige forsøg [se Guidance Document No. 116 (7)], bør det dog overvejes at bruge en stamme, der har en acceptabel overlevelsesfrekvens, til det langvarige forsøg. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige.

▼M4

**Opbevaring og fodringsbetingelser**

17. Dyrene kan anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Enkeltvis anbringelse bør kun anvendes, hvis det er videnskabeligt begrundet (27) (28) (29). Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Foderet skal opfylde alle de ernæringskrav, som den pågældende art af forsøgsdyr stiller, og indholdet af forureninger i foderet, herunder, men ikke begrænset til pesticidrester, persistente organiske miljøgifte, fytoøstrogener, tungmetaller og mycotoksiner, der kan påvirke testresultatet, skal være så lavt som muligt. Analytiske oplysninger om ernæring og koncentration af forurenende stoffer i foderet genereres periodisk, som minimum i begyndelsen af forsøget og derefter, når der sker ændringer i det anvendte parti, og de registreres i den endelige rapport. Analytiske oplysninger om det anvendte drikkevand i forsøget bør også anføres. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af testkemikaliet og opfylde dyrenes ernæringsbehov, når denne administrationsmåde anvendes.

**Forberedelse af dyrene**

18. Der anvendes raske dyr, som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst syv døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg. Hvis der anvendes gnavere, bør doseringen indledes snarest efter fravænning og akklimatisering, og helst inden dyrene er otte uger gamle. Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og alder. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen for hvert køn af de anvendte dyr være mindst mulig og må for hvert køn ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten for alle dyr i forsøget. Dyrene randomiseres til henholdsvis kontrol og behandlingsgruppe. Efter randomisering bør der for hvert køn ikke være signifikante forskelle i den gennemsnitlige kropsvægt mellem grupperne. Hvis der er statistisk signifikante forskelle, gentages randomiseringstrinnet, hvis det er muligt. Hvert dyr tildeles et unikt identifikationsnummer og mærkes permanent med dette nummer ved hjælp af tatovering, mikrochipimplantation eller anden egnet metode.

FREMGANGSMÅDE

**Dyrenes antal og køn**

19. Begge køn anvendes. Der anvendes et antal dyr, der sikrer, at der kan foretages en grundig biologisk og statistisk evaluering. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets karcinogenicitetsfase indeholde mindst 50 dyr af hvert køn. Afhængigt af formålet med forsøget kan den statistiske styrke af nøgleestimater forøges ved differentielt og ulige at tildele dyr til de forskellige dosisgrupper, idet der tildeles mere end 50 dyr til lavdosisgrupperne, f.eks. for at skønne det karcinogene potentiale ved lave doser. Det skal dog anerkendes, at en moderat forøgelse af gruppestørrelsen kun vil give en forholdsvis lille forøgelse af forsøgets statistiske styrke. For gnavere bør hver dosisgruppe (som beskrevet i afsnit 22) og den samtidige kontrolgruppe beregnet til forsøgets kronisk toksicitetsfase indeholde mindst 10 dyr af hvert køn. Det bemærkes, at dette antal er lavere end i forsøget

▼M4

vedrørende kronisk toksicitet (kapitel B.30 i dette bilag). Fortolkningen af data fra det reducerede antal dyr pr. gruppe i den kronisk toksicitetsfase af dette kombinerede forsøg støttes dog af data fra det større antal dyr i forsøgets karcinogenicitetsfase. I forsøg med mus skal der evt. bruges flere dyr i hver dosisgruppe i den kroniske toksicitetsfase til at udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser. Yderligere oplysninger om forsøgets statistiske design og valg af dosisniveauer med henblik på at maksimere den statistiske styrke findes i Guidance Document No. 116 (7).

**Reserve til aflivninger under forsøget, satellitgruppe og sentineldyr**

20. Forsøget kan omfatte reserver til aflivninger under forsøget, f.eks. ved seks måneder for den kroniske toksicitetsfase, for at fremskaffe oplysninger om progression af ikke-neoplastiske forandringer og mekanistisk information, hvis det er videnskabeligt begrundet. Hvis sådanne oplysninger allerede er tilgængelige fra tidligere toksicitetsforsøg med gentagen dosering vedrørende testkemikaliet, er aflivninger under forsøget muligvis ikke videnskabeligt begrundet. De dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer data om aflivning under forsøget til forsøgets karcinogenicitetsfase, hvilket sikrer en generel reduktion i det anvendte antal dyr. Satellitgrupper kan medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie. Disse begrænses normalt til det højeste dosisniveau i forsøget plus kontrol. En yderligere gruppe af sentineldyr (typisk fem dyr pr. køn) kan om nødvendigt også inkluderes med henblik på overvågning af sygdomsstatus i løbet af forsøget (30). Yderligere vejledning om forsøgsdesignet med henblik på at medtage dyr til aflivning under forsøget samt satellit- og sentineldyr, samtidig med at det samlede antal dyr i forsøget minimeres, findes i Guidance Document No. 116 (7).

21. Hvis satellitdyr og/eller aflivninger under forsøget indgår i forsøgsdesignet, skal antallet af dyr i hver dosisgruppe, som medtages til dette formål, normalt være 10 dyr pr. køn, og det samlede antal dyr i forsøgsdesignet forøges med det antal dyr, der planlægges aflivet inden forsøgets afslutning. Dyr, der planlægges aflivet under forsøget, og satellitdyr underkastes de samme observationer, herunder kropsvægt og foder-/vandindtagelse, hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser som dyrene i hovedforsøgets kroniske toksicitetsfase, selv om der også kan medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet.

**Dosisgrupper og dosering**

22. Vejledning om alle aspekter af dosisvalg og intervaller mellem dosisniveauer findes i Guidance Document No. 116 (7). Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe for både den kroniske toksicitetsfase og karcinogenicitetsfasen. Dosisniveauer baseres generelt på resultaterne af forsøg med gentagen dosis af kortere varighed eller dosisbestemmende forsøg (»range finding«) og skal tage hensyn til kendte toksikologiske og toksokinetiske data for testkemikaliet eller tilsvarende kemikalier.

▼M4

23. For forsøgets kroniske toksicitetsfase kan et fuldstændigt forsøg med anvendelse af tre dosisniveauer betragtes som unødvendigt, hvis det kan forventes, at en test, der gennemføres med et dosisniveau svarende til mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, næppe vil fremkalde negative virkninger. Dette bør baseres på informationer fra forforsøg og det forhold, at toksicitet ikke forventes ud fra kendskab til strukturelt beslægtede kemikalier. En grænse på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

24. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af testkemikaliets fysisk-kemiske tilstand eller biologiske egenskaber, vælges det højeste dosisniveau, som gør det muligt at identificere de primære målorganer og samtidig undgå lidelse, svære toksiske virkninger, morbiditet eller død. Normalt vælges det højeste dosisniveau, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. en formindskelse af kropsvægten (mindre end 10 %). Afhængigt af forsøgets formål (se afsnit 6) kan der dog vælges en højeste dosis, der er lavere end den dosis, der fremkalder toksicitetstegn, f.eks. hvis en dosis fremkalder en negativ virkning, som giver anledning til bekymring, men alligevel har ringe indvirkning på levetid eller kropsvægt.

25. Dosisniveauer og dosisintervaller kan vælges, så der fastlægges et forhold mellem dosis og respons og, afhængigt af testkemikaliets virkningsmåde, en NOAEL eller et andet ønsket resultat af forsøget, f.eks. en BMD (se afsnit 27). Faktorer, der skal tages i overvejelse ved fastlæggelsen af de laveste doser, omfatter dosis-responskurvens forventede hældning, de doser, hvor der kan forekomme vigtige forandringer i metabolismen, eller den toksiske virkning, hvor en tærskel forventes, eller hvor et udgangspunkt for lavdosisekstrapolation forventes. Når et kombineret forsøg vedrørende karcinogenicitet/kronisk toksicitet gennemføres, er det primære mål at fremskaffe oplysninger til vurdering af karcinogenicitetsrisici, og oplysninger om kronisk toksicitet er normalt det sekundært mål. Dette skal erindres, når dosisniveauer og dosisintervaller vælges til forsøget.

26. Det valgte dosisinterval afhænger af forsøgsformålene og testkemikaliets karakteristika og kan ikke beskrives i denne testmetode, men to- til firedobbelte intervaller er ofte bedst til fastlæggelse af faldende dosisstørrelser, og tilføjelse af en fjerde testgruppe er ofte at foretrække frem for brug af meget store intervaller (f.eks. mere end en faktor på 6-10) mellem dosisstørrelserne. Faktorer på mere end 10 bør generelt undgås og skal i givet fald begrundes.

27. Som beskrevet i Guidance Document No. 116 (7) skal følgende bl.a. overvejes i forbindelse med dosisvalg:

— kendte eller mistænkte ikke-lineariteter eller inflektionspunkter i dosis-respons

— toksikokinetik og dosisintervaller, hvor metabolisk induktion, mætning eller ikke-linearitet mellem eksterne og interne doser forekommer eller ikke forekommer

— præcursorlæsioner, virkningsmarkører eller indikatorer for underliggende biologiske nøgleprocessers virkning

▼M4

— vigtige (eller mistænkte) aspekter af virkningsmåde, som f.eks. dosis, hvorved cytotoksicitet begynder at stige, hormonniveauer forstyrres, homøstatiske mekanismer belastes osv.

— områder af dosis-responskurven, hvor der kræves særlig robust estimering, f.eks. i intervaller for den forventede BMD eller en mistænkt tærskel

— overvejelse af forventede eksponeringsniveauer for mennesker, navnlig med hensyn til valget af mellemhøje og lave doser.

28. Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af testkemikaliet. Bortset fra behandling med testkemikaliet skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i testgrupperne. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med vehiklet i det største anvendte volumen blandt doseringsgrupperne. Hvis et testkemikalie administreret i foderet medfører væsentligt reduceret fødeindtagelse på grund af foderets dårligere smag, kan det være nyttigt med en kontrolgruppe, der parallelfodres.

**Fremstilling af doser og administration af testkemikalie**

29. Testkemikaliet indgives normalt oralt via foderet eller drikkevandet eller gennem sonde. Yderligere oplysninger om administrationsveje og -metoder findes i OECD Guidance Document No. 116 (7). Valget af administrationsvej og -metode afhænger af formålet med forsøget, testkemikaliets fysisk-kemiske karakteristika, dets biotilgængelighed og den måde, hvorpå mennesker primært eksponeres for testkemikaliet. Der gives en begrundelse for den valgte administrationsvej og -metode. Af hensyn til dyrevelfærden bør oral sonde kun anvendes i forbindelse med stoffer, for hvilke denne administrationsvej og -metode med rimelighed repræsenterer en potentiel eksponeringsmåde for mennesker (f.eks. lægemidler). I forbindelse med kemikalier, der bruges i fødevarer eller miljøet, administreres testkemikaliet typisk via foderet eller drikkevandet. I nogle scenarier, f.eks. erhvervsmæssig eksponering, kan andre administrationsveje være mere hensigtsmæssige.

30. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes testkemikaliet i et egnet vehikel. For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende karakteristika tages i betragtning: dets effekt på testkemikaliets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand bør vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Der bør forefindes oplysninger om testkemikaliets stabilitet og homogeniteten af doseringsopløsninger eller foder (hvis det er relevant) ved den anvendte administrationsform (f.eks. gennem foder).

31. For testkemikalier, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende testkemikalie i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. I langvarige toksicitetsforsøg med administration via foderet må testkemikaliets koncentration i foderet normalt ikke overstige en øvre grænse på 5 % af den samlede fodermængde for at undgå ernæringsmæssige ubalancer. Når testkemikaliet administreres i foderet, kan det administreres som en konstant koncentration i foderet (mg/kg foder eller ppm) eller som en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt (mg/kg kropsvægt) beregnet ugentligt. Det anvendte alternativ anføres.

▼M4

32. Ved oral administration gives testkemikaliet dagligt til dyrene (syv dage om ugen) normalt i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen) (se også afsnit 33 og 34). Andre doseringsregimer, f.eks. fem dage om ugen, skal begrundes. Ved dermal applikation behandles dyrene normalt med testkemikaliet i mindst seks timer om dagen, syv dage om ugen, som beskrevet i kapitel B.9 i dette bilag (11), i en periode på 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Eksponering ved inhalation gennemføres seks timer om dagen, syv dage om ugen, men eksponering fem dage om ugen kan anvendes, hvis det begrundes. Eksponeringen varer normalt 12 måneder (den kroniske fase) eller 24 måneder (karcinogenicitetsfasen). Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Der bør gives en begrundelse, når der anvendes en eksponeringsvarighed på mindre end seks timer om dagen. Se også kapitel B.8 i dette bilag (9).

33. Hvis testkemikaliet indgives med sonde, skal det gøres i en enkelt dosis, med anvendelse af en mavesonde eller et passende intubationsrør på samme tidspunkt hver dag. Normalt administreres én dosis en gang dagligt. Hvis et kemikalie f.eks. er et lokalirriterende stof, kan den daglige dosis dog administreres som en deldosis (to gange om dagen). Den maksimale væskemængde, som kan administreres ad gangen, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Volumenet skal være så lavt som praktisk muligt og må normalt ikke overstige 1 ml/100 g kropsvægt for gnavere (31). Variationer i testvolumen skal minimeres ved at justere koncentrationerne, så der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Dette gælder dog ikke potentielt ætsende eller irriterende kemikalier, som skal fortyndes for at undgå alvorlige lokale virkninger. Test ved koncentrationer, der sandsynligvis kan være ætsende eller irriterende for mave-tarmkanalen, bør undgås.

**Forsøgets varighed**

34. Doseringsperioden og varigheden af dette forsøgs kroniske fase er normalt 12 måneder, men forsøgsdesignet gør det også muligt at udføre forsøg med enten kortere (f.eks. seks eller ni måneder) eller længere (f.eks. 18 eller 24 måneder) varighed, afhængigt af de specifikke lovgivningskrav eller mekanistiske formål. Afvigelser fra eksponeringsvarigheden på 12 måneder skal begrundes, især ved kortere varigheder. Alle dosisgrupper, der er tildelt til denne fase, afsluttes på det tidspunkt, der er fastsat til evaluering af kronisk toksicitet og ikke-neoplastisk patologi. Satellitgrupper, der medtages med henblik på at overvåge reversibiliteten af toksikologiske virkninger induceret af det undersøgte testkemikalie, bevares uden dosering i en periode på mindst fire uger og højst en tredjedel af den samlede forsøgsvarighed efter ophør af eksponering.

35. Varigheden af forsøgets karcinogenicitetsfase er normalt 24 måneder for gnavere, dvs. størstedelen af de anvendte dyrs levetid. Der kan anvendes kortere eller længere forsøgsvarigheder afhængigt af levetiden for den stamme af dyr, der anvendes i forsøget, men varigheden skal begrundes. For bestemte stammer af mus, f.eks. AKR/J, C3H/J eller C57BL/6J, kan en varighed på 18 måneder være mere hensigtsmæssig. I det følgende gives der oplysninger om forsøgsvarighed, afbrydelse af forsøget og overlevelse. Yderligere vejledning, herunder overvejelse af, om negativ karcinogenicitet kan accepteres i forhold til overlevelse i forsøget, findes i OECD Guidance Document No. 116 (7).

▼M4

— Afbrydelse af forsøget skal overvejes, når antallet af overlevende i de laveste dosisgrupper eller kontrolgrupper falder til under 25 %.

— Hvis kun gruppen med den højeste dosis dør før tiden på grund af toksicitet, bør det ikke medføre afbrydelse af forsøget.

— Overlevelse vurderes separat for hvert køn.

— Forsøget bør ikke forlænges ud over det punkt, hvor dataene fra forsøget ikke længere er tilstrækkelige til at understøtte en statistisk gyldig evaluering.

OBSERVATIONER (DEN KRONISKE TOKSICITETSFASE)

36. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Almindelig klinisk observation bør foretages mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er), idet man tager i betragtning, hvornår maksimal effekt kan forventes efter sondeindgift.

37. Detaljerede kliniske undersøgelser gennemføres af alle dyrene i hvert fald før første eksponering (for at tage højde for individuelle forskelle), ved slutningen af den første uge af forsøget og derefter en gang månedlig. Protokollen for undersøgelser tilrettelægges, således at variationer mellem individuelle undersøgere minimeres, og således at den er uafhængig af testgruppen. Disse undersøgelser skal foretages uden for burene, fortrinsvis på et standardareal og på samme tid i hvert tilfælde. De skal noteres omhyggeligt, fortrinsvis ved anvendelse af et scoringssystem, eksplicit defineret af testlaboratoriet. Man bør bestræbe sig på, at variationerne i undersøgelsesbetingelserne er mindst mulige. Observationerne bør bl.a. omfatte ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion, ekskretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflod, strittende hårlag, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Forandringer i gang, stilling og respons på håndtering såvel som tilstedeværelse af toniske og kloniske bevægelser, stereotypi (f.eks. overdreven pudsning, repetitive cirkelbevægelser) eller bizar opførsel (f.eks. selvmutilation, baglæns gang) skal også noteres (32).

38. Oftalmologisk undersøgelse ved hjælp af oftalmoskop eller andet passende udstyr bør udføres på alle dyr inden første administration af testkemikaliet. Ved forsøgets afslutning foretages denne undersøgelse helst på alle dyr, men i det mindste på alle dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der opdages øjenforandringer, der kan tilskrives behandlingen, skal alle dyrene undersøges. Hvis strukturel analyse eller andre informationer antyder øjentoksicitet, øges frekvensen af øjenundersøgelser.

39. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et neurotoksisk potentiale, kan reaktiviteten over for sensoriske stimuli af forskellig art (32) (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive stimuli) (33), (34), (35), gribestyrke (36) og motorisk aktivitet (37) eventuelt vurderes inden påbegyndelsen af forsøget og derefter med tre måneders mellemrum, indtil der er gået 12 måneder, og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). Nærmere oplysninger om de fremgangsmåder, der kan benyttes, findes i de respektive referencer. Andre alternative fremgangsmåder end de refererede kan imidlertid også anvendes.

▼M4

40. For kemikalier, hvor tidligere 28-dages eller 90-dages toksicitetstest med gentagen dosering har indiceret et immunotoksisk potentiale, kan yderligere undersøgelser af denne effektparameter udføres ved forsøgsafslutning.

*Kropsvægt, foder-/vandindtagelse og foderudnyttelse*

41. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

*Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver*

42. I forsøg med gnavere foretages hæmatologisk undersøgelse af alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) ved 3, 6 og 12 måneder og ved forsøgsafslutning (hvis senere end 12 måneder). I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede hæmatologiske undersøgelser (se afsnit 19). I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på hæmatologiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse.

43. Følgende parametre bør undersøges (38): total og differential leucocyttælling, erythrocyttælling, blodpladetælling, hæmoglobinkoncentration, hæmatokrit, middelcellevolumen (MCV), middelcellehæmoglobin (MCH), middelcellehæmoglobinkoncentration (MCHC), protrombintid og aktiveret partiel tromboplastintid. Andre parametre for hæmatologi, som f.eks. Heinz-legemer eller andre atypiske parametre for erythrocytmorfologi eller methæmoglobin, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Generelt bør der benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af de observerede og/eller forventede virkninger af et givet testkemikalie. Hvis testkemikaliet har indvirkning på det hæmopoietiske system, kan retikulocyttællinger og knoglemarvcytologi også være indiceret, selv om de ikke skal foretages rutinemæssigt.

44. Klinisk kemiske målinger med henblik på undersøgelse af toksisk virkning på væv og specielt på nyrer og lever skal foretages på blodprøver taget fra alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske undersøgelser. I forsøg med mus skal der evt. bruges satellitdyr for at kunne udføre alle de krævede klinisk kemiske målinger. I forsøg med ikke-gnavere udtages prøver fra et mindre antal dyr (f.eks. 4 dyr pr. køn og pr. gruppe i hundeforsøg) ved mellemliggende prøvetagningstidspunkter og ved forsøgsafslutning som beskrevet for gnavere. Målinger ved tre måneder foretages ikke hos hverken gnavere eller ikke-gnavere, hvis der ikke er konstateret virkninger på klinisk-biokemiske parametre i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Dyrene (dog ikke mus) bør

▼M4

faste inden blodprøvetagning ([1]). Følgende parametre bør undersøges (38): glukose, urea (urinstof), kreatinin, total protein, albumin, kalcium, natrium, kalium, total kolesterol, mindst to relevante test med henblik på hepatocellulær evaluering (alanin-aminotransferase, aspartat-aminotransferase, glutamat-dehydrogenase og totale galdesyrer) (39) og mindst to relevante test med henblik på hepatobiliær evaluering (alkalisk fosfatase, gamma-glutamyl-transferase, 5′-nucleotidase, total bilirubin og totale galdesyrer) (39). Andre klinisk-kemiske parametre, som f.eks. fastende triglycerider, specielle hormoner og kolinesterase, kan måles afhængigt af testkemikaliets toksicitet. Der skal generelt benyttes en fleksibel tilgang afhængigt af den observerede og/eller forventede virkning af et testkemikalie.

45. Urinanalyser udføres på alle forsøgsdyr (10 handyr og 10 hundyr pr. gruppe) med samme tidsintervaller som de hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser. Målinger ved tre måneder foretages ikke, hvis der ikke er konstateret virkninger på urinanalyse i et tidligere 90-dages forsøg gennemført ved hjælp af sammenlignelige dosisniveauer. Følgende liste over parametre indgik i en ekspertanbefaling vedrørende kliniske patologiforsøg (38): udseende, volumen, osmolalitet eller vægtfylde, pH, total protein og glukose. Andre parametre omfatter keton, urobilinogen, bilirubin og hæmaturi. Andre parametre kan inkluderes, hvis det er nødvendigt at udvide undersøgelsen af en eller flere observerede virkninger.

46. Der er generel enighed om, at hæmatologiske og klinisk-biokemiske baselinevariabler er nødvendige inden behandling i forbindelse med hundeforsøg, men de er ikke nødvendige i forsøg med gnavere (38). Hvis de historiske baselinedata (se afsnit 58) er utilstrækkelige, bør det overvejes at fremskaffe sådanne data.

PATOLOGI

*Makroskopisk obduktion*

47. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal normalt have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger, og kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Der kan dog også medtages reserver (i grupperne for aflivning under forsøget) til målinger alene af specifikke nøgleparametre, som f.eks. neurotoksicitet eller immunotoksicitet (se afsnit 21). Disse dyr underkastes dog ikke obduktion og de fremgangsmåder, der er beskrevet i det følgende. Sentineldyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde.

([1]) Til en del analyser på serum og plasma, mest udtalt for glukose, foretrækkes fastende blodprøver. Hovedårsagen er den øgede variation, som uundgåeligt følger ikkefaste, og som vil kunne maskere små effekter og derved gøre tolkningen vanskelig. På den anden side vil faste kunne influere på dyrenes almindelige stofskifte, specielt i forsøg, hvor foderindtagelse står centralt, og derved forstyrre den daglige belastning med testkemikaliet. Alle dyr bør vurderes i samme fysiologiske tilstand, og detaljerede eller neurologiske vurderinger bør derfor efter planen gennemføres en anden dag end udtagningen af de klinisk-biokemiske prøver.

▼**M4**

48. Organvægte registreres for alle dyr, bortset fra dyr som er udelukket i medfør af sidste del af afsnit 47. Binyrer, hjerne, bitestikler, hjerte, nyrer, lever, ovarier, milt, testikler, skjoldbruskkirtel (vejet efter fiksering, med paratyreoideae) og uterus skal på alle dyr renses for andet vedhængende væv som behørigt (undtaget er de dyr, der findes døende og/eller aflives undervejs i forsøget) og vejes snarest muligt efter dissektionen for at undgå udtørring.

49. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alle større læsioner | Hjerte | Bugspytkirtel | Mavesæk (formave, kirtelmave) |
| Binyrer | Ileum | Biskjoldbruskkirtel | [Tænder] |
| Aorta | Jejunum | Perifer nerve | Testikler |
| Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | Nyre | Hypofyse | Brisler |
| Cæcum | Tårekirtel (ekstraorbital) | Prostata | Skjoldbruskkirtel |
| Cervix | Lever | Rectum | [Tunge] |
| Prostata anterior | Lunge | Spytkirtel | Luftrør |
| Tyktarm | Lymfeknuder (både overfladiske og dybe) | Vesiculae seminales | Urinblære |
| Duodenum | Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr) | Skeletmuskel | Uterus med cervix |
| Epididymis | [Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser] | Hud | [Ureter] |
| Øje (herunder retina) | Øsofagus | Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal) | [Urethra] |
| [Femur med led] | [Bulbus olfactorius] | Milt | Vagina |
| Galdeblære (for andre arter end rotte) | Æggestok | [Sternum] | Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat |
| Harderian-kirtel | | | |

▼M4

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (9) og kapitel B.29 i dette bilag (10). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

*Histopatologi*

50. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). De histopatologiske undersøgelser skal som minimum omfatte:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter

— målvæv eller væv, der udviser behandlingsrelaterede forandringer i højdosisgruppen, fra dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

OBSERVATIONER (KARCINOGENICITETSFASEN)

51. Alle dyr kontrolleres for morbiditet eller mortalitet, normalt morgen og aften, alle ugens dage. Dyrene kontrolleres desuden en gang om dagen for specifikke tegn af toksikologisk relevans. Ved sondeforsøg kontrolleres dyrene i perioden umiddelbart inden doseringen. Særlig opmærksomhed rettes mod udviklingen af tumorer, og på tidspunktet for den første tumordannelse registreres lokalisering, dimensioner, fremtræden og progression af hver makroskopisk synlig eller palpabel tumor.

52. Alle dyr vejes ved begyndelsen af behandlingen, mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Foderindtagelse og -udnyttelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen i de første 13 uger og derefter mindst én gang om måneden, når testkemikaliet administreres i vandet. Måling af vandindtagelse bør også overvejes i forsøg, hvor drikkeaktiviteten ændres.

▼M4

*Hæmatologiske, klinisk-biokemiske og patologiske undersøgelser*

53. For at udlede flest mulige informationer fra forsøget, især med hensyn til virkningsmåde, kan blodprøver efter forsøgslederens vurdering udtages med henblik på hæmatologiske og klinisk-biokemiske undersøgelser. Urinanalyse kan også være relevant. Data om dyr, der anvendes i forsøgets kroniske toksicitetsfase, normalt af 12 måneders varighed (afsnit 34), fremskaffer oplysninger om disse parametre. Yderligere vejledning om fordelene ved at udtage sådanne prøver i forbindelse med karcinogenicitetsforsøg findes i Guidance Document No. 116 (7). Hvis blodprøver udtages, tages de ved slutningen af forsøgsperioden lige før eller i forbindelse med aflivningen af dyrene. Blodprøver udtages fra et udpeget sted, f.eks. ved hjertepunktur eller fra retro-orbital sinus, under bedøvelse. Blodsmears kan også forberedes til undersøgelse, navnlig hvis knoglemarv tilsyneladende er målorganet, selv om der ikke er enighed om værdien af en sådan undersøgelse i karcinogenicitetsfasen i forbindelse med vurderingen af karcinogent/onkogent potentiale (38).

PATOLOGI

*Makroskopisk obduktion*

54. Alle dyr, som indgår i forsøget, skal med undtagelse af sentineldyr (se afsnit 20) og andre satellitdyr have udført en fuldstændig, detaljeret makroskopisk obduktion, hvilket inkluderer omhyggelig undersøgelse af alle overflader, alle åbninger samt kraniets, brystkassens og abdomens kaviteter og deres indhold. Sentineldyr og andre satellitdyr skal evt. obduceres, men det afgøres af forsøgslederen i hvert enkelt tilfælde. Organvægt indgår normalt ikke i karcinogenicitetsforsøg, da geriatriske forandringer og i senere faser udviklingen af tumorer konfunderer anvendeligheden af data om organvægt. Organvægt kan dog være vigtig til at udføre en weight of evidence-evaluering og overvejelser vedrørende virkningsmåde. Hvis organvægt indgår i et satellitforsøg, registreres værdierne senest et år efter forsøgsstart.

55. Følgende væv skal præserveres ved hjælp af det mest passende fikseringsmiddel både med henblik på vævstypen og den følgende histopatologiske undersøgelse (se afsnit 40) (væv i kantet parentes er valgfrit):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Alle større læsioner | Hjerte | Bugspytkirtel | Mavesæk (formave, kirtelmave) |
| Binyrer | Ileum | Biskjoldbruskkirtel | [Tænder] |
| Aorta | Jejunum | Perifer nerve | Testikler |
| Hjerne (herunder udsnit af cerebrum, cerebellum og medulla/pons) | Nyre | Hypofyse | Brisler |
| Cæcum | Tårekirtel (ekstraorbital) | Prostata | Skjoldbruskkirtel |
| Cervix | Lever | Rectum | [Tunge] |
| Prostata anterior | Lunge | Spytkirtel | Luftrør |
| Tyktarm | Lymfeknuder (både overfladiske og dybe) | Vesiculae seminales | Urinblære |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Duodenum | Brystkirtel (obligatorisk for hundyr og, hvis de er synligt dissekerbare, for handyr) | Skeletmuskel | Uterus med cervix |
| Epididymis | [Øvre luftveje, herunder næse, muslingeben og paranasale sinusser] | Hud | [Ureter] |
| Øje (herunder retina) | Øsofagus | Rygmarv (på tre niveauer: (cervikal, midt-torakal og lumbal) | [Urethra] |
| [Femur med led] | [Bulbus olfactorius] | Milt | Vagina |
| Galdeblære (for andre arter end rotte) | Æggestok | [Sternum] | Sektion af knoglemarven og/eller frisk knoglemarvsaspirat |
| Harderian-kirtel | | | |

I tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer. Kliniske og andre fund kan foranledige undersøgelse af andet væv. Også særlige organer, der sandsynligvis kan være mål for testkemikaliets kendte virkninger, bør præserveres. I forsøg, der omfatter dermal applikation, skal de organer, der er opført på listen over organer ved oral administration, undersøges, og specifik prøvetagning og præservation af huden fra applikationsstedet skal foretages. I inhalationsforsøg skal listen over væv, der skal præserveres og undersøges fra luftvejene, følge anbefalingerne i kapitel B.8 i dette bilag (8) og kapitel B.29 i dette bilag (9). For andre organer/væv (og i tillæg til de væv, der specifikt er præserveret fra luftvejene) skal de organer, der er anført for oral administration, undersøges.

*Histopatologi*

56. Der foreligger vejledning om bedste praksis i forbindelse med gennemførelsen af toksikologiske patologiforsøg (40). Følgende væv skal som minimum undersøges:

— alle væv fra højdosis- og kontrolgruppen

— alle væv fra dyr, som er døde eller aflivet under forsøget

— alle væv, som udviser makroskopiske abnormiteter, herunder tumorer

— når behandlingsrelaterede histopatologiske forandringer observeres i højdosisgruppen, undersøges disse væv fra alle dyr i alle andre dosisgrupper

— i tilfælde af parrede organer, f.eks. nyrer og binyrer, præserveres begge organer.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING (KARCINOGENICITET OG KRONISK TOKSICITET)

**Data**

57. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr for alle evaluerede parametre. Yderligere skal alle data opsummeres i tabeller, der for hver testgruppe viser antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr fundne døde i løbet af testen eller aflivede af humane grunde og tidspunktet for deres død, det antal dyr, der udviser tegn på toksicitet, en beskrivelse af disse tegn, inklusive tidspunktet for deres begyndelse, deres varighed og toksicitetsgraden; det antal dyr, der har læsioner, typen af læsioner og den procentdel af dyrene, der udviser de forskellige typer af læsion. I oversigtstabeller anføres middel- og standardafvigelser (for kontinuerlige testdata) for dyr, der udviser toksiske virkninger eller læsioner, samt gradueringen af læsioner.

58. Historiske kontroldata kan være værdifulde i forbindelse med fortolkningen af forsøgsresultaterne, f.eks. hvis der er tegn på, at data fra de samtidige kontroller er væsentligt afvigende i forhold til nylige data fra kontroldyr fra samme forsøgslaboratorium/koloni. Historiske kontroldata, som evalueres, bør indgives fra samme laboratorium og vedrøre dyr af samme alder og stamme genereret i de fem år forud for det aktuelle forsøg.

59. Hvor det er muligt, skal tallene evalueres ved hjælp af en passende og accepteret statistisk metode. Den statistiske metode og de data, der skal analyseres med den, skal vælges under planlægningen af forsøget (se afsnit 9). Ved udvælgelse bør der tages behov for evt. justeringer for overlevelse.

60. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— fysiske egenskaber, renhedsgrad og fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— testkemikaliets kilde

— batchnummer

— certifikat for kemisk analyse.

*For eventuelt vehikel:*

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

*For forsøgsdyrene:*

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse

— dyrenes antal, alder og køn ved forsøgsstart

— herkomst, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

▼**M4**

*Testbetingelser:*

— begrundelse for valg af administrationsvej og dosis

— de statistiske metoder, der er anvendt til dataanalyse, hvis relevant

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning

— analysedata om opnået koncentration, stabilitet og homogenitet for tilberedningen

— administrationsvej og nærmere oplysninger om administrationen af testkemikaliet

— eksponering gennem næsen og helkropseksponering for inhalationsforsøg

— faktiske doser (mg/kg kropsvægt/dag) og omregningsfaktor fra testkemikaliets koncentration i foder/vand (mg/kg eller ppm) til faktisk dosis, hvis muligt

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

*Resultater (opsummerende data og data for individuelle dyr opstilles i tabelform):*

*Generelt*

— data om overlevelse

— kropsvægt og ændringer i kropsvægt

— foderindtagelse, beregning af foderudnyttelse og indtagelse af vand, hvis muligt

— toksikokinetiske data, hvis de forefindes.

— oftalmoskopi (hvis tilgængelig)

— hæmatologi (hvis tilgængelig)

— klinisk kemi (hvis tilgængelig).

*Kliniske fund*

— tegn på toksicitet

— incidens (og sværhedsgrad, hvis de er vurderet) af abnormiteter

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er forbigående eller permanente).

*Obduktionsdata*

— kropsvægt ved forsøgets slutning

— organvægt og deres forhold, hvis relevant

— obduktionsfund; incidens og sværhedsgrad af abnormiteter.

*Histopatologi*

— ikkeneoplastiske histopatologiske fund

▼M4

— neoplastiske histopatologiske fund

— korrelation mellem makroskopiske og mikroskopiske fund

— detaljeret beskrivelse af alle behandlingsrelaterede histopatologiske fund, herunder sværhedsgrader

— rapport om peer review af objektglas.

*Evt. statistisk behandling af resultaterne*

*Diskussioner af resultater, herunder:*

— diskussion af tilgange til modellering

— dosis-responsforhold

— historiske kontroldata

— overvejelse af oplysninger om virkningsmåde

— bestemmelse af BMD, NOAEL eller LOAEL

— relevans for mennesker.

*Konklusioner*

*LITTERATUR:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rom, 1995), internt arbejdsdokument, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Kapitel B.27 i dette bilag, Subkronisk oral toksicitetstest — et 90-dages forsøg over gentagne orale dosers toksicitet på ikke-gnavere.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 og 453 — Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, findes på OECD's offentlige websted for Test Guidelines på www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.8 i dette bilag. Subkronisk toksicitet (inhalation): 28-dages forsøg

(10) Kapitel B.29 i dette bilag, Subkronisk toksicitet (inhalation): 90-dages forsøg

(11) Kapitel B.9 i dette bilag, Toksicitet ved gentagen dosering (28 dage, dermal).

▼M4

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36:793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN og Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA og Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. I D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼M4

(27) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R et al. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA-dokument (udkast) »Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity« (Dok. ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼B

B.34. **REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I EN GENERATION**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

Se den generelle indledning til del B.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Flere grupper af han- og hundyr doseres med teststoffet, idet der gives en dosis pr. gruppe. Handyr doseres under væksten og under mindst en fuldstændig spermiedannelsescyklus (ca. 56 dage for mus og 70 dage for rotter) med henblik på at fremkalde sundhedsmæssige uønskede virkninger, teststoffet måtte have på spermatogenesen.

Hundyr i $F_0$-generationen doseres i mindst to fuldstændige østrale perioder for at fremkalde de skadelige virkninger, teststoffet eventuelt måtte have på brunsten. Derefter parres dyrene. Begge køn doseres med teststof i parringsperioden, og derefter doseres kun hundyrene i drægtighedsperioden og laktationsperioden. Hvis dosering med teststof foregår ved inhalation, kræves ændringer af metoden.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Ingen.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

*Forberedelser*

Unge, sunde, kønsmodne dyr fordeles randomiseret i grupper. Dyrene holdes under forsøgsbetingelser med hensyn til miljø og fodring i mindst fem dage, inden forsøget påbegyndes. Det anbefales, at teststoffet administreres med foderet eller drikkevandet. Andre former for administration kan også accepteres. Alle dyr skal doseres på samme måde i hele forsøgsperioden. Hvis der anvendes et vehikel eller andre tilsætningsstoffer for at lette doseringen, skal det være påvist, at de ikke har nogen toksisk virkning. Dyrene skal doseres med teststoffet syv dage om ugen.

▼B

Forsøgsdyr

*Valg af dyreart*

Rotten eller musen er de foretrukne forsøgsdyr. Stammen bør ikke have en lav fertilitet. Der benyttes sunde dyr, som ikke tidligere har været anvendt i forsøg. Forsøgsdyrene bør være velbeskrevne med hensyn til art, stamme, køn, vægt og/eller alder.

For at få en adækvat vurdering af fertilitet skal både han- og hundyr undersøges. Alle dyr i forsøgsgrupper og kontrolgrupper skal være fravænnet, før dosering påbegyndes.

*Antal og køn*

Hver enkelt forsøgs- og kontrolgruppe skal indeholde tilstrækkelig mange dyr, til at der kan findes ca. 20 drægtige hundyr, som er nær ved eller på fødetidspunktet.

Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom, til at der kan foretages en meningsfuld vurdering af teststoffets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i $F_0$-generationen samt dieadfærd, vækst og udvikling i $F_1$-generationen fra undfangelse til dyrene er vænnet fra.

Forsøgsbetingelser

Foder og vand gives ad libitum. Når fødetidspunktet nærmer sig, placeres de drægtige hundyr i hvert sit bur, idet der benyttes fødebure eller yngelbure, og dyrene kan eventuelt forsynes med materiale til redebygning.

Dosisniveauer

Der anvendes mindst tre forskellige dosisniveauer samt en kontrolgruppe. Hvis der anvendes et vehikel, doseres kontrolgruppen med samme mængde vehikel som den gruppe, der modtager den højeste dosis. Hvis et teststof fører til formindsket foderindtagelse eller interfererer med absorption og stofskifte, kan det være nødvendigt at anvende en kontrolgruppe, som er matchet med hensyn til foder. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, bør den højeste dosis forårsage toksisk virkning, men ikke dødsfald i forældre ($F_0$)-generationen. Middeldosis (evt. flere) bør fremkalde de mindste konstaterbare toksiske virkninger af teststoffet, og den laveste dosis bør ikke have nogen toksisk effekt hverken på forældregenerationen eller afkommet, Hvis stoffet indgives med mavesonde eller i kapsel, bør den dosis, som hvert enkelt dyr modtager, udregnes på grundlag af dyrets legemsvægt og ugentligt tilpasses ændringer i denne legemsvægt. Dosering af drægtige hundyr kan baseres på legemsvægten på dag 0 eller 6, hvis man ønsker det.

Grænsetest

Hvis der ikke konstateres nogen virkning på reproduktionen ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg af et lavtoksisk stof, kan yderligere testning betragtes som unødvendig. Hvis en indledende undersøgelse, hvor kun den højeste dosis benyttes, klart viser toksisk virkning på moderdyret, men ikke har nogen skadelig virkning på fertiliteten, kan yderligere testning betragtes som unødvendig.

▼B

*Fremgangsmåde*

Forsøgsplan

Daglig dosering af forældre ($F_0$)-generationen indledes, når dyrene er mellem fem og ni uger gamle, og efter at de er vænnet fra og akklimatiseret i mindst fem dage. Hvis der anvendes rotter, fortsættes doseringen i ti uger før parringsperioden (ved mus otte uger). Handyrene skal enten aflives og undersøges efter parringsperioden, eller man kan fortsætte med at indgive dem teststoffet frem til en mulig produktion af et andet kuld, hvorefter de aflives og undersøges, et stykke tid før undersøgelsen afsluttes. Dosering af forældregenerationens hundyr indledes efter mindst fem dages akklimatisering og fortsætter mindst to uger før parring. Daglig dosering af $F_0$-hundyrene fortsættes gennem den tre uger lange parringsperiode, drægtighedsperioden og op til $F_1$-generationen er vænnet fra. Man bør overveje eventuelle ændringer i forsøgsplanen, hvis der foreligger informationer om teststoffet fra specielle stofskifteundersøgelser eller undersøgelse af akkumulation.

Parring

Der kan anvendes parring i forholdet 1:1 (et handyr og et hundyr) eller 1:2 (et handyr og to hundyr) i undersøgelser af reproduktionstoksicitet.

Anvendes 1:1 parring, anbringes et hundyr med ethandyr, indtil der indtræder drægtighed, eller tre uger er gået, Hver morgen undersøges hundyrene for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 fastlægges under hensyntagen til spermatogenesen som den dag, hvor der observeres vaginalprop eller sperma.

De par, som ikke parrer sig, bør undersøges for fastlæggelse af årsagen til den tilsyneladende ufrugtbarhed.

Dette kan gøres ved, at dyrene f.eks. får lejlighed til at parre sig med han- eller hundyr, hvis frugtbarhed er påvist, ved mikroskopisk undersøgelse af reproduktionsorganerne og ved undersøgelse af den østrale periode eller spermatogenesen.

Kuldstørrelse

De dyr, som doseres i fertilitetsundersøgelsen, bør have lov til at yngle normalt og pleje deres afkom frem til afvænning uden standardisering.

Hvis der gennemføres standardisering, foreslås følgende fremgangsmåde. Mellem dag 1 og 4 efter fødslen, standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fire handyr og fire hundyr,

Hvis det på grund af antallet af han- og hundyr ikke er muligt at standardisere hvert kuld, så det indeholder fire af hvert køn, kan delvis standardisering accepteres (f.eks. fem handyr og tre hundyr). Der foretages ikke standardisering af kuld på mindre end otte unger.

▼B

Observation

Dyrene inspiceres mindst en gang om dagen under hele forsøget. Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller forlænget fødsel og alle toksicitetstegn herunder mortalitet, registreres. Før og under parringsperioden registreres foderindtagelsen ugentligt. I drægtighedsperioden kan foderindtagelsen (og vandindtagelsen, hvis teststoffet administreres heri) registreres dagligt. Efter fødslen og i dieperioden måles foderindtagelsen på de samme dage, som kuldene vejes. Han- og hundyr af $F_0$-generationen vejes den dag, doseringen indledes og derefter en gang om ugen. Disse observationer bar rapporteres individuelt for hvert enkelt udvokset dyr.

Drægtighedsperioden beregnes fra dag 0. Hvert kuld undersøges så hurtigt som muligt efter fødslen for at fastslå ungernes antal og køn, antal dødfødte og levendefødte og forekomst af makroskopisk synlige abnormiteter.

Døde unger og unger, som aflives på dag 4, skal opbevares og undersøges for mulige defekter. Levende unger tælles, og kuldet vejes morgenen efter fødslen, på dag 4 og dag 7, og derefter en gang om ugen indtil undersøgelsens afslutning, hvor dyrene skal vejes individuelt.

Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter, som observeres hos hundyrene eller afkommet skal registreres.

*Patologisk undersøgelse*

Makroskopisk undersøgelse

$F_o$-generationsdyr, som aflives efter eller dør under forsøget, undersøges makroskopisk med henblik på konstatering af strukturelle abnormiteter eller patologiske forandringer, idet opmærksomheden særlig rettes mod reproduktionssystemet. Døde eller døende unger undersøges for defekter.

Histopatologisk undersøgelse

Ovarier, uterus, cervix, vagina, testikler, bitestikler, sædblærer, prostata, accessoriske kønskirtler, hypofyse og målorgan(er) fra alle dyr i $F_0$-generationen præpareres med henblik på mikroskopisk undersøgelse. Skulle det undtagelsesvist forekomme, at disse organer endnu ikke har været underkastet undersøgelse i andre forsøg med multipel dosering, undersøges organerne fra dyrene i den gruppe, der har modtaget den højeste dosis, og i kontrolgruppen samt de dyr, som er døde under forsøget, mikroskopisk, hvis det er praktisk muligt.

Hvis der konstateres abnormiteter i organer fra disse dyr, undersøges disse organer også hos alle andre dyr i $F_0$-generationen. Der foretages i så fald mikroskopisk undersøgelse af alle væv, som udviser makroskopisk patologiske forandringer. Som anført i afsnittet parring kan reproduktionsorganerne fra dyr, som formodes at være ufrugtbare, også underkastes mikroskopisk undersøgelse.

▼B

2. **DATA**

Data opstilles i tabelform, som for hver gruppe viser antal dyr ved begyndelsen af forsøget, antal frugtbare handyr, antal drægtige hundyr, typer af forandringer og den procentdel dyr, som udviser hver enkelt type forandring.

Evaluering af resultaterne baseres så vidt muligt på en passende statistisk metode. Enhver anerkendt statistisk metode kan anvendes.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— anvendt dyreart/stamme

— oplysning om toksisk respons inddelt efter køn og dosis, herunder fertilitet, drægtighed og afkommets levedygtighed

— dødstidspunkt under forsøget eller overlevelse til forsøgets afslutning eller planlagt aflivningstidspunkt

— tabel med angivelse af vægten af hvert enkelt kuld, ungernes gennemsnitlige vægt og hver enkelt unges vægt ved forsøgets afslutning

— toksisk eller anden virkning på reproduktion, afkom, postnatal vækst

— observationstidspunkt for hvert enkelt abnormitetstegn og den senere udvikling af abnormiteten

— data for foder- og legemsvægt for Fo-generationen

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle mikroskopiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne

— diskussion af resultaterne

— fortolkning af resultaterne.

3.2. VURDERING OG FORTOLKNING

Se den generelle indledning til del B.

4. **HENVISNINGER**

Se den generelle indledning til del B.

▼B

B.35. **REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I TO GENERATIONER**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 416 (2001).

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode til reproduktionsundersøgelse i to generationer er at skaffe generelle oplysninger om et teststofs effekter på forplantningssystemets integritet og funktion hos han- og hundyr, herunder gonadefunktion, brunstcyklus, parringsadfærd, konception, drægtighed, fødsel, laktation og fravænning samt afkommets vækst og udvikling. Undersøgelsen kan desuden give oplysninger om teststoffets effekter på den neonatale morbiditet og mortalitet samt foreløbige data om præ- og postnatal udviklingstoksicitet, foruden at tjene som vejledning for efterfølgende forsøg. Ud over at undersøge $F_1$-generationens vækst og udvikling har metoden til formål at vurdere forplantningssystemets integritet og funktion hos han- og hundyr samt vækst og udvikling i $F_2$-generationen. For at skaffe supplerende viden om udviklingstoksicitet og funktionelle mangler kan man enten supplere denne protokol med forsøgsafsnit, som alt efter behov er baseret på metoder til undersøgelse af udviklingstoksicitet og/eller udviklingsneurotoksicitet, eller gøre disse endpoints til genstand for særskilte forsøg med egnede forsøgsmetoder.

1.2. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Teststoffet administreres i graduerede doseringer til flere grupper hanner og hunner. Hannerne i P-generationen ($F_0$-generationen) modtager stoffet i vækstperioden og i mindst én hel spermatogenesecyklus (ca. 56 døgn hos mus og 70 døgn hos rotter) for at fremkalde eventuelle negative virkninger på spermatogenesen. Effekterne på sperma bestemmes ved en række spermaparametre (f.eks. spermiemorfologi og -motilitet) og ved fremstilling af vævspræparater til detaljeret histopatologisk undersøgelse. Hvis der foreligger data vedrørende spermatogenesen fra et tidligere forsøg med gentagen dosering af tilstrækkelig varighed, f.eks. et 90-dages forsøg, behøver hannerne i P-generationen ikke indgå i vurderingen. Det anbefales dog at opbevare prøver eller digitale optagelser af spermier fra P-generationen med henblik på senere vurdering. Hunner i P-generationen doseres i vækstperioden og gennem flere hele brunstcyklusser for at bestemme eventuelle negative virkninger af teststoffet på den normale brunstcyklus, Teststoffet administreres til forældredyrene (P) i parringsperioden, gennem den resulterende drægtighedsperiode og gennem fravænningsperioden af afkommet $F_1$, Fra fravænningstidspunktet administreres stoffet til $F_1$-afkommet under dettes opvækst og ind i voksenalderen, parringsperioden og frembringelse af en $F_2$-generation, indtil $F_2$-generationen er fravænnet.

Alle dyr iagttages klinisk og undersøges patologisk for tegn på toksicitet med særlig vægt på integritet og funktion af forplantningssystemet hos han- og hundyr samt afkommets vækst og udvikling.

▼B

1.3 BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.3.1. **Valg af dyreart**

Rotten er den foretrukne art til forsøget. Anvendes andre arter, bør dette begrundes, og passende modifikationer vil være nødvendige. Der bør ikke anvendes stammer med ringe frugtbarhed eller kendt høj forekomst af udviklingsdefekter. Ved forsøgets begyndelse skal vægtvariationen mellem de anvendte dyr være mindst mulig og for hvert køn ikke over 20 % af gennemsnitsvægten.

1.3.2. **Miljøbetingelser og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og bør ikke overstige 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand. Valget af foder kan afhænge af nødvendigheden af at sikre passende iblanding af teststoffet, når denne administrationsmåde anvendes.

Dyrene kan enten anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn. Parring bør finde sted i bure egnede til formålet. Efter tegn på kopulation anbringes de parrede hunner enkeltvis i fødebure eller yngelbure. De parrede rotter kan også holdes i små grupper og adskilles en eller to dage før fødslen. Parrede dyr skal forsynes med egnet og nærmere bestemt redemateriale, når fødselstidspunktet nærmer sig.

1.3.3. **Forberedelse af dyrene**

Der anvendes raske unge dyr. som er akklimatiseret til laboratoriemiljøet i mindst fem døgn og ikke tidligere er indgået i forsøg, Forsøgsdyrene skal være karakteriseret med hensyn til art, stamme, oprindelse, køn, vægt og/eller alder. Eventuelle søskenderelationer mellem dyrene skal være kendt, så parring af søskende undgås. Dyrene fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper (stratificering efter kropsvægt anbefales). Burene skal arrangeres således, at eventuelle virkninger af burenes placering er mindst mulig. Hvert dyr tilordnes et unikt identifikationsnummer, For P-generationen skal dette ske inden doseringen begynder, For $F_1$-generationen skal dette ske ved fravænningen for dyr, som udvælges til parring. For alle udvalgte $F_1$-dyr registreres, hvilket kuld de er fra. Når det overvejes at benytte individuel vejning af unger eller foretage funktionstest, anbefales, at ungerne identificeres individuelt snarest efter fødslen.

Forældredyr (P) skal være 5 til 9 uger gamle, når doseringen påbegyndes. Dyrene i alle forsøgsgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder.

▼B

1.4. FREMGANGSMÅDE

1.4.1. **Dyrenes antal og køn**

I hver behandlings- og kontrolgruppe skal der være tilstrækkeligt med dyr til, at gruppen ved eller nær fødselstidspunktet består af helst mindst 20 drægtige hunner, For stoffer, som er årsag til uønskede behandlingsrelaterede virkninger (f.eks. sterilitet, stærk toksicitet i den høje dosering), kan dette eventuelt være umuligt. Formålet er at producere tilstrækkeligt med afkom til at sikre en meningsfuld vurdering af teststoffets potentiale for påvirkning af fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd og diegivning, $F_1$-afkommets vækst og udvikling fra undfangelsen til fuld kønsmodning, og udviklingen af dettes afkom ($F_2$), frem til dyrene er vænnet fra. Hvis det ikke er lykkedes at frembringe det ønskede antal drægtige dyr (dvs. 20), er undersøgelsen ikke dermed nødvendigvis ugyldig, og der bør finde en konkret vurdering sted i det enkelte tilfælde.

1.4.2. **Tilberedning af doser**

Det anbefales, at teststoffet administreres oralt (i foderet, i drikkevandet eller med sonde), medmindre en anden administrationsvej (f.eks. dermal applikation eller inhalation) anses for mere velegnet.

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, derefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie), og først derefter eventuel opløsning i andre vehikler. For andre vehikler end vand må vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Teststoffets stabilitet i vehiklet skal bestemmes.

1.4.3. **Dosering**

Der skal være mindst tre dosisgrupper og en sideløbende kontrolgruppe. Medmindre der optræder begrænsninger som følge af teststoffets fysisk-kemiske natur eller biologiske egenskaber, skal den højeste dosering vælges således, at den giver toksisk effekt, men ikke død eller alvorlige lidelser. I tilfælde af uventet dødelighed er forsøg med en dødelighed på under ca. 10 % i forældregenerationen (P) normalt stadig acceptable. Der vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons samt det niveau, hvor ingen skadelig effekt iagttages (NOAEL). Ved fastlæggelse af en sådan aftagende række dosisniveauer vil det optimale interval ofte svare til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må det foretrækkes at tilføje en fjerde behandlingsgruppe frem for at operere med meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. I undersøgelser med indgift i foderet bør dosisintervallet ikke være større end svarende til en faktor 3. Doseringen vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitetsdata, især resultaterne af forsøg med gentagen dosering. Eventuelle foreliggende oplysninger om metabolisme og kinetik af teststoffet eller beslægtede stoffer skal ligeledes tages i betragtning. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre det hensigtsmæssige i den valgte dosering.

▼B

Kontrolgruppen skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til administration af teststoffet. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgruppen (-grupperne) håndteres på samme måde som behandlingsgruppen. Anvendes vehikel, skal dyrene i kontrolgruppen modtage vehiklet i det største anvendte volumen. Hvis et teststof administreret i foderet medfører reduceret fødeindtagelse eller -udnyttelse, kan parvis fodring sammen med kontrolgruppen være nødvendig. I stedet for parvis fodring sammen med kontrolgruppen kan anvendes data fra kontrollerede undersøgelser, som er udformet til vurdering af virkningerne af nedsat fødeindtagelse på reproduktionsparametrene.

For vehiklet og andre tilsætningsstoffer skal følgende egenskaber tages i betragtning: Dets effekt på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention, dets eventuelle indvirkning på teststoffets kemiske egenskaber med deraf følgende ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand.

1.4.4. **Grænsetest**

Såfremt et oralt enkeltdosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/døgn eller en ækvivalent procentdel tilsat foderet eller drikkevandet med de til dette forsøg beskrevne metoder hverken frembringer observerbar toksisk virkning i forældredyrene eller deres afkom, og såfremt foreliggende data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser ikke giver anledning til at forvente nogen virkning, er et komplet forsøg med flere dosisniveauer ikke nødvendigvis påkrævet, Grænsetesten skal være gældende, medmindre den påregnede udsættelse af mennesker tilsiger, at der anvendes et højere oralt dosisniveau. For andre administrationsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. opløseligheden, ofte være bestemmende for og begrænsende for det maksimale opnåelige ekspositionsniveau.

1.4.5. **Administration af doser**

Dyrene modtager teststoffet syv dage om ugen. Oral administration (foder, drikkevand eller sonde) er at foretrække. Anvendes anden administrationsvej, bør valget begrundes, og passende modifikationer kan være nødvendige. Alle dyr skal modtage stoffet på samme måde i den pågældende forsøgsperiode. Administreres teststoffet med sonde, skal en gastrisk sonde anvendes. Der må ikke på én gang gives et væskevolumen over 1 ml/l00 g kropsvægt (for majsolie ikke over 0,4 ml/100 g kropsvægt), bortset fra vandige opløsninger, som kan gives i mængder på 2 ml/100 g kropsvægt, Hvis der ikke er tale om lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis er værre ved højere koncentration, skal variabiliteten af testvolumenet minimeres gennem justering af koncentrationen, således at der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. I forsøg med indgift gennem sonde vil ungerne normalt kun få teststoffet indirekte gennem mælken, indtil den direkte dosering begynder ved fravænning. I forsøg med indgift gennem foder eller drikkevand vil ungerne desuden modtage teststoffet direkte, når de begynder selv at æde i den sidste del af laktationsperioden.

▼B

For stoffer administreret i foderet eller drikkevandet er det vigtigt at sikre, at det pågældende teststof i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance, Ved indgift af teststoffet i foderet kan stoffet enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; det skal angives, hvilken mulighed der er valgt. Ved indgift med sonde skal dosis gives pa tilsvarende tidspunkt hver dag og skal justeres mindst en gang om ugen, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Ved justering af doseringen via sonde på grundlag af vægten skal kendskabet til fordelingsforholdene i placenta tages betragtning,

1.4.6. **Forsøgsplaner**

Den daglige indgift til hanner og hunner i forældregenerationen (P) begynder, når dyrene er 5 til 9 uger gamle. Den daglige dosering af hanner og hunner i $F_1$-generationen begynder ved fravænningen; man bør have for øje. at ved administration af teststoffet i foder eller drikkevand kan ungerne i $F_1$-gruppen blive direkte eksponeret for teststoffet allerede i laktationsperioden. For begge køn (P og $F_1$) skal doseringen fortsætte i mindst 10 uger før parringsperioden. Doseringen fortsætter hos begge køn i den to uger lange parringsperiode. Når der ikke længere er brug for handyrene til vurdering af reproduktionstoksiske virkninger, aflives de af humane grunde og undersøges. For hunner i forældregenerationen (P) fortsætter doseringen gennem hele drægtighedspeiioden og indtil fravænning af afkommet i $F_1$-generationen. Ændringer i doseringsplanen må overvejes ud fra de foreliggende oplysninger om teststoffet, herunder foreliggende toksicitetsdata, induktion af metabolisering samt bioakkumulering. Doseringen til det enkelte dyr bør normalt baseres på den seneste individuelle bestemmelse af dyrets vægt. I drægtighedsperiodens sidste trimester må dog udvises forsigtighed med justering af doseringen.

Behandlingen af hanner og hunner i P- og $F_1$-generationen skal fortsætte til forsøgets afslutning, Af humane grunde aflives alle voksne hanner og hunner i P- og $F_1$-generationen, når der ikke længere er brug for dem til vurdering af reproduktionstoksiske virkninger. Af humane grunde aflives de dyr i $F_1$ generationen, som ikke udvælges til parring, og alle dyr i $F_2$-generationen.

1.4.7. **Parringsmetode**

1.4.7.1. *Parring af forældregenerationen (P)*

Til hver parring anbringes hver hun sammen med én han på samme dosisniveau (1:1 parring), indtil kopulation finder sted eller der er gået to uger. Hunnerne undersøges hver dag for tilstedeværelse af sperma eller vaginalprop. Drægtighedsperiodens dag 0 er den dag, hvor der findes en vaginalprop eller sperma. Lykkes parring ikke, kan fornyet parring af hunnerne med afprøvede hanner fra samme gruppe overvejes. De parrede dyr skal være tydeligt identificeret i data. Parring af søskende skal undgås.

▼B

1.4.7.2. *Parring af $F_1$*

Til parring af $F_1$-afkommet vælges mindst én han og én hun fra hvert kuld ved afvænningen til parring med andre unger på samme dosisniveau, men fra et andet kuld, med henblik på frembringelse af $F_2$-generationen. Valg af unger fra hvert kuld skal ske tilfældigt, når der ikke iagttages væsentlige forskelle i kropsvægt eller udseende mellem magerne fra kuldene. Iagttages sådanne forskelle, vælges den bedste repræsentant for hvert kuld. Det mest pragmatiske er at dette sker på vægtbasis, men det kan være mere hensigtsmæssigt at lade det ske på basis af udseendet. $F_1$-afkommet må ikke parres, før de er fuldt kønsmodne.

Par uden afkom vurderes med henblik på bestemmelse af den tilsyneladende årsag til steriliteten. Dette kan bestå i at give mulighed for en ekstra parring med afprøvede fædre eller mødre, makroskopisk undersøgelse af kønsorganerne og undersøgelse af brustcyklus eller spermatogenese.

1.4.7.3. *Anden parring*

I visse tilfælde, således ved behandlingsrelaterede ændringer i kuldstørrelse eller tvivlsom effekt af første parring, anbefales det, at de voksne dyr i P- eller $F_1$-generationen parres igen, så de får endnu et kuld unger. Det anbefales, at de hanner eller hunner, som ikke har frembragt afkom, parres igen med påvist yngledygtige dyr af det modsatte køn. Hvis det skønnes nødvendigt at producere et ekstra kuld i nogen af generationerne, skal dyrene parres igen ca. en uge efter fravænning af sidste kuld.

1.4.7.4. *Kuldstørrelse*

Dyrene skal yngle på normal måde og pleje afkommet indtil fravænning. Standardisering af kuldstørrelserne er frivillig. Anvendes standardisering, skal metoden beskrives i detaljer.

1.5. OBSERVATIONER

1.5.1. **Klinisk observation**

Dyrene observeres dagligt klinisk, og ved sondeindgift foretages denne observation under hensyntagen til tidspunktet for den forventede maksimale virkning efter administrationen. Adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller langstrakt fødsel og alle tegn på toksicitet registreres. En yderligere, mere detaljeret undersøgelse af hvert dyr foretages mindst en gang ugentligt, hvilket passende kan ske i forbindelse med vejning af dyret. Alle dyr iagttages to gange dagligt for morbiditet ug mortalitet, i weekenden én gang dagligt når det er hensigtsmæssigt.

▼B

1.5.2. **Forældredyrenes kropsvægt og føde- og vandindtagelse**

Forældredyrene (P og $F_1$) vejes den første dag de modtager stoffet og derefter mindst en gang om ugen. Hunnerne i forældregenerationerne (P og $F_1$) vejes som minimum på dag 0, 7, 14, og 20 eller 21 i drægtighedsperioden, i laktationsperioden på de dage, hvor kuldene vejes, samt på aflivningsdagen. Disse iagttagelser rapporteres individuelt for hvert voksent dyr. I tiden før parring og i drægtighedsperioden skal fødeindtagelsen måles mindst en gang om ugen. Vandindtagelsen skal måles mindst en gang om ugen, hvis teststoffet gives i vandet.

1.5.3. **Brunstcyklus**

Hos hunnerne i P- og $F_1$-generationen vurderes brunstcyklussens længde og normale forløb med vaginalt smear før parring samt ikke obligatorisk i parringsperioden, indtil der findes tegn på parring, Udtagning af celleprøve fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå forstyrrelse af slimhinden med efterfølgende induktion af pseudodrægtighed (1).

1.5.4. **Spermaparametre**

For alle hanner i P- og $F_1$ generationen registreres vægten af testes og epididymides ved forsøgets slutning, og det ene af hvert organ udtages til histopatologisk undersøgelse (se punkt 1.5.7, 1.5.8.1). Fra en delmængde bestående af mindst 10 hanner af hver gruppe hanner i P- og $F_1$-generationen anvendes de øvrige testes og epididymides til tælling af henholdsvis homogeniseringsresistente spermatider og spermiebeholdning i cauda epididymidis. For samme delmængde af hanner opsamles sperma fra cauda epididymidis eller vas deferens til undersøgelse af spermiemotilitet og spermiemorfologi. Hvis der iagttages behandlingsrelaterede virkninger eller der i andre undersøgelser er fundet tegn på en mulig påvirkning af spermatogenesen, skal spermaundersøgelse finde sted hos alle hanner i hver dosisgruppe; ellers kan optællingen indskrænkes til kontrolgruppen og hannerne i højdosisgrupperne i P og $F_1$.

Det samlede antal homogeniseringsresistente testikulære spermatider og spermier i cauda epididymidis opgøres (2)(3). Spermiebeholdningen i cauda kan beregnes af spermiekoncentration og -volumen i den suspension, der benyttes til den kvalitative vurdering og antallet af spermier, som opsamles ved findeling og/eller homogenisering af det øvrige caudavæv. Optællingen på den valgte delmængde af hanner af alle dosisgrupper foretages straks efter aflivning af dyrene, medmindre prøverne fryses og analyseres senere, I disse tilfælde kan kontroldyrene og højdosisgruppen analyseres først. Hvis der ikke optræder behandlingsrelaterede virkninger (på f.eks, spermietal, -motilitet og -morfologi), behøver de andre dosisgrupper ikke analyseres. Findes der behandlingsrelaterede virkninger i højdosisgruppen, skal grupperne på lavere dosis også analyseres.

▼B

Motiliteten af spermier i epididymis (eller ductus deferens) bedømmes eller optages på videobånd straks efter aflivning. Udtagning af af spermier skal ske på en måde, så skaden er mindst muligt, og spermierne fortyndes med henblik på motilitetsanalyse med acceptable metoder (4). Procentdelen af fremadbevægelige (progressivt motile) spermier bestemmes enten subjektivt eller objektivt. Foretages der computerassisteret motilitetsanalyse (5)(6)(7)(8)(9)(10) er beregningen af progressiv motilitet baseret på brugerdefinerede tærskelværdier for gennemsnitsvejlængde, hastighed og retlinjethed (lineært indeks). Hvis der optages videobånd af prøverne (11) eller billederne på anden måde registreres på obduktionstidspunktet, kan den efterfølgende analyse af handyr i P- og $F_1$-generationen indskrænkes til kontrol- og højdosisgrupppen, medmindre der konstateres behandlingsrelaterede virkninger, i hvilket tilfælde også grupperne på de lavere doseringer skal bedømmes. I mangel af videooptagelse eller digitalt billede skal alle prøver fra alle behandlingsgrupper analyseres ved obduktionen.

Der foretages en morfologisk bedømmelse af en spermaprøve fra epididymis (eller vas deferens), Spermier (mindst 200 i hver prøve) undersøges som fikserede, våde præparater (12) og klassificeres som enten normale eller anormale. Som eksempel på morfologiske spermieabnormiteter kan nævnes sammensmeltning, isoleret hoved og misdannet hoved og/eller hale. Optællingen finder sted på den udvalgte delmængde af hanner fra alle grupper enten straks efter aflivning af dyrene eller senere baseret på videobånd og digitale optagelser, Smears kan, når først de er fikseret, undersøges senere. I disse tilfælde kan kontroldyrene og højdosisgruppen analyseres først. Hvis der ikke optræder behandlingsrelaterede virkninger (f.eks. virkninger på spermiemorfologien), behøver de andre dosisgrupper ikke analyseres. Når der konstateres behandlingsrelaterede virkninger i højdosisgruppen, skal grupperne på lavere dosering også analyseres.

Hvis nogen af ovennævnte parametre for spermieevaluering allerede er undersøgt som led i en systemisk toksicitetsundersøgelse af mindst 90 dages varighed, behøver de ikke nødvendigvis gentages i to generationers forsøget. Det anbefales dog, at prøver eller digitale optagelser af spermier fra P-generationen opbevares for at give mulighed for senere vurdering, hvis dette viser sig nødvendigt.

1.5.5. **Afkom**

Hvert kuld undersøges hurtigst muligt efter fødslen (dag 0 i laktationsperioden) til bestemmelse af ungernes antal og køn. dødfødte, levendefødte og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter. Unger, som findes døde på dag 0 bør, hvis de ikke er opløst, helst undersøges for eventuelle defekter og dødsårsag og præserveres. Levende unger tælles og vejes enkeltvis ved fødslen (dag 0 i laktationsperioden) eller på dag 1, og derefter på de regelmæssige vejningsdage, dvs, på dag 4, 7, 14 og 21 i laktationsperioden. Fysiske eller adfærdsmæssige abnormiteter iagttaget hos moderdyr eller afkom skal registreres.

▼B

Afkommets fysiske udvikling skal registreres, hovedsagelig som stigning i kropsvægt, Andre fysiske parametre (f.eks åbning af ører og øjne, tandfrembrud, hårvækst) kan give supplerende oplysninger, men evalueringen deraf bør fortrinsvis finde sted sammen med data vedrørende kønsmodning (f.eks. alder og kropsvægt på tidspunktet for åbning af vagina eller for den balano-præputiale separation) (13). Det anbefales at udføre funktionelle undersøgelser (f.eks udvikling i motorisk aktivitet, sansefunktioner, reflekser) på $F_1$-generationen før og/eller efter afvænning, medmindre sådanne undersøgelser indgår i særskilte forsøg: Især gælder dette undersøgelser relateret til kønsmodningen. For de fravænnede unger i $F_1$-generationen, som er udvalgt til parring, bestemmes alderen på tidspunktet for åbning af vagina og separation af præputium. På ungerne i $F_2$-generationen måles den anogenitale afstand ved dag 0 efter fødslen, når dette tilsiges af forandringer i Figenerationens kønssammensætning eller tidspunktet for kønsmodning.

Funktionsundersøgelser kan udelades for grupper, som på anden måde viser tydelige tegn på negative påvirkninger (f.eks. væsentligt nedsat tilvækst osv.). Foretages der funktionsundersøgelser, skal disse ikke omfatte de unger, der er udvalgt til parring.

1.5.6 **Makroskopisk undersøgelse ved obduktion**

Ved forsøgets slutning eller ved indtræden afdød under undersøgelsen undersøges alle forældredyr (P og $F_1$), alle unger med ydre abnormiteter eller kliniske symptomer samt en (et) tilfældigt udvalgt unge/køn/kuld fra både $F_1$- og $F_2$-generationen makroskopisk for eventuelle strukturabnormiteter og patologiske forandringer. Særligt kønsorganerne skal undersøges. Unger, som aflives af humane grunde i moribund tilstand samt døde unger, når de ikke er opløst, undersøges for eventuelle defekter og/eller dødsårsag og præserveres.

På alle førstegangsfødende hunner undersøges uterus på en måde, som ikke vanskeliggør histopatologisk bedømmelse, for tilstedeværelse af og antal implantationssteder.

1.5.7. **Organvægt**

Ved forsøgets afslutning bestemmes kropsvægt og vægten af følgende organer på alle forældredyr i P-generationen og $F_1$-generationen (parrede organer vejes enkeltvis):

— uterus, ovarier

— testes, epididymides (total og cauda)

— prostata

— vesiculae seminales med prostata anterior (coagulating glands) og disses væskeindhold samt prostata (som én samlet enhed)

— hjerne, lever, nyrer, milt, hypofyse, skjoldbruskkirtel og binyrer samt kendte målorganer.

Kropsvægten ved forsøgets slutning bestemmes for under i $F_1$- og $F_2$-generationen, som udvælges til obduktion, og følgende organer fra den (det) ene tilfældigt udvalgte unge/køn/kuld (se punkt 1.5.6) vejes: hjerne, milt og thymus.

▼B

Resultaterne af den makroskopiske obduktion og organvejningen sammenholdes, når det er praktisk muligt, med observationer fra andre forsøg med gentagen dosering.

1.5.8. **Histopatologi**

1.5.8.1. *Forældredyr*

Følgende organer og væv fra forældredyr (P og $F_1$) eller repræsentative prøver deraf fikseres og opbevares i et passende medium til histopatologisk undersøgelse:

— vagina, uterus med cervix og ovarier (præserveret i hensigtsmæssigt fiksativ)

— én testis (præserveret i Bouins fiksativ eller tilsvarende), én epididymis, vesiculae seminales, prostata og prostata anterior (coagulating gland)

— tidligere udpegede målorgan(er) fra alle de dyr i P- og $F_1$-generationen, som er udvalgt til parring.

Af ovennævnte præserverede organer og væv foretages fuldstændig histopatologisk undersøgelse for alle de dyr i højdosis- og kontrolgrupperne i P- og $F_1$-generationen, som er udvalgt til parring. Undersøgelse af ovarierne fra dyrene i P-generationen er ikke obligatorisk. De organer fra lav- og mellemdosisgrupperne, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, skal ligeledes undersøges som led i fastsættelsen af NOAEL. Derudover skal den histopatologiske undersøgelse omfatte kønsorganerne fra de dyr i lav- og mellemdosisgruppen, som mistænkes for nedsat fertilitet, fordi de f.eks. ikke har været i stand til at parre sig, undfange, besvangre eller føde rask afkom, eller hvis brunstcyklus, spermietal -motilitet eller -morfologi var påvirket. Alle makroskopiske forandringer som atrofi eller tumorer undersøges.

Detaljeret histopatologisk undersøgelse af testes (f.eks. med Bouins fiksativ, paraffinfiksering og tværsnit af 4-5µm's tykkelse) skal foretages til påvisning af behandlingsrelaterede effekter som manglende frigivelse af spermatider, manglende kimcellelag eller -typer, multinukleære kæmpeceller eller vandring af spermatogene celler ind i lumen (14). Undersøgelse af den intakte epididymis skal omfatte caput, corpus og cauda, hvilket kan ske ved vurdering af et længdesnit. Epididymis skal gennemgås med henblik på leukocytinfiltration, ændret forekomst af celletyper, afvigende celletyper, og fagocytose af spermier. Til undersøgelse af handyrenes kønsorganer kan anvendes PAS- og hæmatoxylinfarvning.

Ovariet i postlaktationsperioden skal indeholde primordial- og voksende follikler foruden de store corpora lutea fra laktationsperioden. Den histopatologiske undersøgelse skal kunne påvise en eventuel kvalitativ forringelse af bestanden af primordialfollikler. For hundyr i $F_1$-generationen foretages en kvantitativ vurdering af primordialfolliklerne; antal dyr, valg af ovariesnit og størrelsen af prøvesnit skal være statistisk tilpasset den anvendte vurderingsmetode. Undersøgelsen skal omfatte en optælling af primordialfollikler, hvilket kan kombineres med optælling af små voksende follikler, med henblik på sammenligning af ovarierne i behandlingsgmppe og kontrolgruppe (15)(16)(17)(18)(19).

▼B

1.5.8.2. *Fravænnede unger*

Makroskopisk abnormt væv og målorganer fra alle unger med ydre abnormiteter eller kliniske symptomer samt fra den/det ene tilfældigt udvalgte unge/køn/kuld fra både $F_1$- og $F_2$-generationen, som ikke er udvalgt til parring, fikseres og opbevares i et passende medium til histopatologisk undersøgelse. Det præserverede væv skal gennemgå fuld histopatologisk karakterisering med særlig vægt på kønsorganerne.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Data rapporteres for hver forsøgsgruppe og generation og sammenfattes i tabelform med angivelse, for hver forsøgsgruppe og hver generation, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal fertiele dyr, antal drægtige hundyr, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af iagttagne toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle de toksiske virkninger, arten af de fund, der er gjort på forældredyr og afkom, arten af de histopatologiske forandringer, og alle relevante data om kuldene.

Til bedømmelse af talmateriale anvendes en hensigtsmæssig, almindelig anerkendt statistisk metode; valg af statistiske metoder skal indgå som en del af undersøgelsens design og skal begrundes. Statistiske modeller for dosis-respons-sammenhæng kan være nyttige til dataanalyse. Rapporten skal indeholde tilstrækkelige oplysninger om analysemetoden til, at en uafhængig rapportør/statistiker kan revurdere og gentage analysen.

2.2. VURDERING AF RESULTATER

Fundene i denne reproduktionsundersøgelse i to generationer vurderes med hensyn til de iagttagne effekter, herunder obduktionsfund og mikroskopiske fund. Vurderingen skal omfatte sammenhæng, eller mangel herpå, mellem dyrenes udsættelse for teststoffet og tilstedeværelse eller fravær, incidens og sværhedsgrad af abnormiteter, herunder makroskopiske forandringer, identificerede målorganer, påvirkning af fertiliteten, unormale kliniske fund, påvirkning af reproduktions- og yngleprestationer, kropsvægtforandringer, indvirkning på mortaliteten og eventuelle toksiske effekter. Prøvestoffets fysisk-kemiske egenskaber og eventuelle foreliggende toksikokinetiske data skal indgå i vurderingen af forsøgets resultater.

En korrekt udført reproduktions-toksicitetsundersøgelse skal give et tilfredsstillende skøn over nulvirkningsniveauet og indsigt i negative virkninger på reproduktion, fødsel, laktation og postnatal udvikling, herunder vækst og kønsmodning.

▼B

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

En reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer giver oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et stof i alle faser af reproduktionscyklussen. Navnlig giver undersøgelsen oplysninger om reproduktionsparametre og om afkommets udvikling, vækst, kønsmodning og overlevelse. Undersøgelsens resultater skal fortolkes i sammenhæng med fundene i forsøgene vedrørende subkronisk toksicitet, prænatal udviklingstoksicitet, toksikokinetik og andre foreliggende undersøgelser. Undersøgelsens resultater kan anvendes til at vurdere behovet for yderligere undersøgelse af et kemisk stof. Undersøgelsens resultater kan i begrænset omfang overføres til mennesker. Resultaterne kan bedst anvendes til at give oplysninger om nulvirkningsniveau og tilladelig eksponering af mennesker (20)(21)(22)(23).

3. **RAPPORTERING**

***FORSØGSRAPPORT***

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata

— renhed.

For eventuel vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand.

**For forsøgsdyrene:**

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, redematerialer osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

**For forsøgsbetingelserne:**

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration

— tilberedningens stabilitet og homogenitet

— oplysninger om administration af teststoffet

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

▼B

For resultaterne:

— fødeindtagelse og vandforbrug, hvis disse foreligger, foderudnyttelse (kropsvægtforøgelse pr. gram indtaget foder), og forbrug af forsøgsmateriale for P- og $F_1$ dyrene, bortset fra perioden hvor dyrene har været sammen og for mindst den sidste tredjedel af laktationsperioden

— absorptionsdata (hvis de foreligger)

— kropsvægtdata for dyrene i P- og $F_1$-generationen udvalgt til parring

— vægtdata for kuld og unger

— kropsvægt ved aflivning og absolut og relativ organvægt for forældredyrene

— art, sværhedsgrad og varighed af kliniske symptomer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— tidspunktet for dødens indtræden under forsøget eller hvorvidt dyrene overlevede til forsøgets afslutning

— toksisk respons fordelt på køn og dosering, med angivelse af indekstal for parring, fertilitet, drægtighed, fødsel, levedygtighed og laktation; rapporten skal angive de tal, der er benyttet til beregning af sådanne indekser

— toksisk effekt eller andre effekter på reproduktion, afkom, postnatal vækst osv.

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— antal hunner i P- og $F_1$-generationen med normal brunstcyklus, og cyklussens længde

— totalt antal spermier i cauda epididymis, procentdel progressivt motile spermier, procentdel morfologisk normale spermier, og procentdel spermier med hver af de fundne abnormiteter

— tid indtil parring, inkl. antal døgn indtil parring finder sted

— drægtighedsperiodens længde

— antal implantationer, corpora lutea, kuldstørrelse

— antal levendefødte og postimplantationstab

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter, antal små uudviklede unger skal angives, hvis de er optalt

— data vedrørende fysiske kendetegn hos unger, og andre data vedrørende den postnatale udvikling; Det skal begrundes, hvilke fysiske kendetegn der er evalueret

— i det omfang det er relevant, data vedrørende iagttagelser af funktioner hos unger og voksne

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne.

▼B

Diskussion af resultater.

Konklusioner, herunder NOAEL (højeste niveau uden tegn på skadelig effekt) for moderdyr og afkom.

4. **HENVISNINGER**


(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mummals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al, (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-lnduced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction und Fertility 54:103-107.

(4) Kimefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology 5:39 44.

(5) Seed. J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology 10(3):237-244.

(6) Chapin, R.E. et al. (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. Journal of Andrology 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologie Considerations. Reproductive Toxicology 5:449-458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(10) Toth. G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologie and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10:401-415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographie Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. and Y.J.Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, I. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.). Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

## B.36. **TOKSIKOKINETIK**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD TG 417 (2010). Forsøg vedrørende et testkemikalies toksikokinetik (TK) gennemføres for at fremskaffe tilstrækkelige oplysninger om dets absorption, fordeling, biotransformation (dvs. metabolisme) og udskillelse til at relatere koncentration eller dosis til den observerede toksicitet og til at opnå en forståelse af dets toksicitetsmekanisme. TK kan hjælpe med at forstå toksikologiforsøgene ved at påvise, at forsøgsdyrene systematisk eksponeres for testkemikaliet, og ved at afdække de omsættende dele (oprindeligt kemikalie/metabolitter). Grundlæggende TK-parametre, der er fastlagt ud fra disse forsøg, giver også information om potentialet for akkumulering af testkemikaliet i væv og/eller organer og potential for induktion af biotransformation som følge af eksponeringen for testkemikaliet.

2. TK-data kan bidrage til en vurdering af relevansen og tilstrækkeligheden af toksicitetsdata vedrørende dyr med henblik på ekstrapolering til fare- og/eller risikovurderinger for mennesker. TK-forsøg kan endvidere give nyttige oplysninger til fastlæggelse af dosisniveauer til toksicitetsforsøg (lineær i forhold til ikke-lineær kinetik), virkninger af administrationsvej, biotilgængelighed og forhold vedrørende forsøgsdesign. Visse typer TK-data kan bruges til udvikling af fysiologisk baserede toksikokinetiske modeller (PBTK).

3. Metabolit-/TK-data kan anvendes på vigtige områder og kan f.eks. give forslag om mulige toksiciteter og virkningsmåder og deres sammenhæng med dosisniveau og eksponeringsvej. Metabolismedata kan desuden fremskaffe oplysninger, der kan bruges til vurdering af den toksikologiske signifikans af eksponering for eksogent producerede metabolitter af testkemikaliet.

4. Tilstrækkelige TK-data kan anvendes til støtte for yderligere accept og anvendelse af tilgange baseret på kvantitative forhold mellem struktur og aktivitet, analogislutninger eller gruppering i forbindelse med sikkerhedsevalueringen af kemikalier. Kinetikdata kan også bruges til at evaluere den toksikologiske relevans af andre forsøg (f.eks. in vivo og in vitro).

5. Medmindre en anden administrationsvej nævnes (se f.eks. afsnit 74-78), gælder denne testmetode for oral administration af testkemikaliet.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

6. Der stilles forskellige krav og anføres forskellige behov i lovgivningerne med hensyn til måling af effektparametre og parametre vedrørende toksikokinetik for de forskellige kemikalieklasser (f.eks. pesticider, biocider og industrikemikalier). I modsætning til de fleste testmetoder beskriver denne testmetode TK-test, der involverer flere målinger og effektparametre. I fremtiden vil der muligvis blive udviklet flere nye testmetoder og/eller vejledninger, som beskriver hver effektparameter separat og i flere detaljer. For så vidt angår denne testmetode, fastlægger det enkelte lovgivningssystem, hvilke test eller vurderinger der skal gennemføres.

▼M4

7. Der er adskillige forsøg, der kan udføres for at evaluere et testkemikalies TK-opførsel i lovgivningsøjemed. Afhængigt af de konkrete lovgivningsbehov eller situationer er det dog ikke nødvendigt at udføre alle disse mulige forsøg for at evaluere et testkemikalie. Designet af TK-forsøg skal være fleksibelt og tage hensyn til karakteristika for det undersøgte testkemikalie. I nogle tilfælde skal kun et bestemt sæt spørgsmål undersøges for at behandle fare- og risikoforholdene i forbindelse med et testkemikalie. I nogle situationer indsamles TK-data i forbindelse med evalueringen i andre toksikologiforsøg. I andre situationer skal der udføres yderligere og/eller mere omfattende TK-forsøg, hvis det kræves i henhold til lovgivningen, og/eller hvis nye spørgsmål rejses under evalueringen af testkemikaliet.

8. Alle tilgængelige informationer om testkemikaliet samt relevante metabolitter og analoger bør overvejes af testlaboratoriet inden gennemførelsen af forsøget med henblik på at forbedre kvaliteten af forsøget og minimere omfanget af dyreforsøg. Dette kan omfatte data fra andre relevante testmetoder (in vivo-forsøg, in vitro-forsøg og/eller in silico-evalueringer). Fysisk-kemiske egenskaber, såsom et testkemikalies fordelingskoefficient octanol/vand (udtrykt som log $P_{OW}$), pKa, vandopløselighed, damptryk og molekylvægt, kan bruges i forbindelse med planlægningen af et forsøg og fortolkning af resultater. De kan bestemmes ved hjælp af hensigtsmæssige metoder som beskrevet i de relevante testmetoder.

BEGRÆNSNINGER

9. Denne testmetode er ikke designet til at tage højde for særlige omstændigheder, f.eks. drægtige eller diegivende dyr og afkom, eller til at evaluere potentielle reststoffer i eksponerede dyr, der anvendes i fødevareproduktionen. Data fra et B.36-forsøg kan dog bruges som baggrundsinformation ved design af specifikke forsøg til sådanne undersøgelser. Denne testmetode er ikke beregnet til test af nanomaterialer. I henhold til en rapport om en foreløbig gennemgang af OECD Test Guidelines med hensyn til deres relevans for nanomaterialer kan TG 417 (svarer til denne testmetode B.36) muligvis ikke anvendes i forbindelse med nanomaterialer (1).

DEFINITIONER

10. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg.

HENSYN TIL DYREVELFÆRD

11. Vejledning om human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (2). Det anbefales, at den OECD-vejledning benyttes ved alle in vivo- og in vitro-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode.

BESKRIVELSE AF METODERNE

**Pilotforsøg**

12. Pilotforsøg anbefales og tilskyndes i forbindelse med valg af forsøgsparametre til TK-forsøg (f.eks. metabolisme, massebalance, analysemetoder, dosisbestemmelse, udånding af $CO_2$ osv.). Karakterisering af nogle af disse parametre kan betyde, at det ikke er nødvendigt at bruge radioaktivt mærkede kemikalier.

▼M4

**Valg af dyr**

*Art*

13. Den dyreart (og stamme), der bruges til TK-test, skal helst være den samme som den, der anvendes i andre toksikologiske forsøg udført med det pågældende testkemikalie. Normalt anvendes rotter, da de hyppigt anvendes i toksikologiske forsøg. Andre eller yderligere arter kan anvendes, hvis kritiske toksikologiforsøg giver bevis for signifikant toksicitet hos disse arter, eller hvis det dokumenteres, at deres toksicitet/toksikokinetik er mere relevant for mennesker. Der skal gives en begrundelse for valg af dyreart og stamme.

14. Medmindre andet nævnes, henviser denne testmetode til rotten som forsøgsdyr. Visse aspekter af metode skal muligvis ændres, hvis andre forsøgsarter bruges.

*Alder og stamme*

15. Der anvendes unge raske voksne dyr (normalt 6-12 uger gamle på doseringstidspunktet) (se også afsnit 13 og 14). Der skal gives en begrundelse, hvis der bruges dyr, som ikke er unge voksne. Alle dyr skal være af samme alder ved forsøgets begyndelse. Med hensyn til vægt må det enkelte dyr ikke afvige mere end ± 20 % fra testgruppens gennemsnitsvægt. Ideelt anvendes den stamme, der også blev anvendt til at etablere den toksikologiske database for testkemikaliet.

*Dyrenes antal og køn*

16. For hver testet dosis anvendes mindst fire dyr af et køn. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.

*Opbevaring og fodringsbetingelser*

17. Dyr opbevares generelt i individuelle bure i forsøgsperioden. Flere dyr i samme bur kan begrundes i særlige tilfælde. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C), og den relative fugtighed skal være 30-70 %. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

**Testkemikalie**

18. Et radioaktivt mærket testkemikalie med $^{14}C$ anvendes i forbindelse med alle aspekter af massebalance- og metabolitbestemmelse i forsøget. Hvis det kan påvises, at:

— massebalance- og metabolitbestemmelse kan evalueres tilstrækkeligt ved hjælp af det umærkede testkemikalie, og

— den analytiske specificitet og sensitivitet af den metode, der anvendes med et ikkeradioaktivt testkemikalie, er lig med eller større end den, der kan opnås med det radioaktivt mærkede testkemikalie

▼M4

er det ikke nødvendigt at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Andre radioaktive og stabile isotoper kan desuden anvendes, hvis elementet f.eks. er ansvarligt for eller indgår i den toksiske del af testkemikaliet. Hvis det er muligt, placeres det radioaktivt mærkede stof i en kernedel af det metabolsk stabile molekyle (det er ikke ombytteligt, det fjernes ikke metabolsk som $CO_2$, og det bliver ikke en del af organismens »one-carbon pool«). Det kan være nødvendigt at mærke flere steder eller bestemte områder af molekylet for at følge testkemikaliets metabolske skæbne.

19. Testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning analyseres ved hjælp af hensigtsmæssige metoder med henblik på at bestemme renhed og identitet. Den radioaktive renhed af det radioaktive testkemikalie skal være det højest mulige for et bestemt testkemikalie (den skal ideelt være mere end 95 %), og det skal tilstræbes at identificere urenheder, der er tilstede ved eller over 2 %. Renheden skal rapporteres sammen med identiteten og andelen af identificerede urenheder. I lovgivningsbestemmelser kan der gives yderligere vejledning i definitionen og specifikationen af testkemikalier, der består af blandinger og metoder til bestemmelse af renhed.

**Valg af dosis**

*Pilotforsøg*

20. Normalt er en enkelt oral dosis nok til pilotforsøget. Dosen skal være ikke-toksisk, men høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) og til at opfylde det anførte formål med pilotforsøget som anført i afsnit 12 i denne testmetode.

*Hovedforsøg*

21. Til hovedforsøgene foretrækkes mindst to doser, da oplysninger indsamlet fra mindst to dosisgrupper kan bruges som en hjælp til at fastlægge dosis i andre toksicitetsforsøg og til at foretage en dosis-responsvurdering af allerede tilgængelige toksicitetstest.

22. Hvis to doser administreres, skal begge doser være høje nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant). Information fra tilgængelige toksicitetsdata skal overvejes ved valg af dosis. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige (f.eks. fra forsøg vedrørende akut oral toksicitet med registrering af kliniske tegn på toksicitet eller fra toksicitetsforsøg med gentagen dosering), kan en værdi for den højeste dosis, der er lavere end $LD_{50}$- (oral og dermal administration) eller $LC_{50}$ (inhalation)-estimatet eller lavere end den laveste værdi af det estimerede interval for akut toksicitet, overvejes. Den laveste dosis skal være en brøkdel af den højeste dosis.

23. Hvis kun et dosisniveau undersøges, skal dosen ideelt være høj nok til at muliggøre identifikation af metabolitter i excreta (og plasma, hvis det er relevant) uden at producere synlig toksicitet. Der gives en begrundelse, hvis der ikke medtages et andet dosisniveau.

24. Hvis virkningen af dosen på de kinetiske processer skal bestemmes, er to doser muligvis ikke nok, og mindst én dosis skal være tilstrækkeligt høj til at mætte disse processer. Hvis området under koncentration-tidskurven for plasma (AUC) ikke er lineært mellem de to dosisniveauer, der er anvendt i hovedforsøget, er det en stærk indikation af, at mætning af en eller flere af de kinetiske processer sker et sted mellem de to dosisniveauer.

▼M4

25. For testkemikalier af lav toksicitet bør en maksimal dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt (oral og dermal administration) anvendes (for oplysninger om inhalation henvises til kapitel B.2 i dette bilag; denne dosis overstiger typisk ikke 2 mg/l). Kemikaliespecifikke overvejelser kan gøre det nødvendigt at anvende en højere dosis, afhængigt af lovgivningen. Valg af dosis skal altid begrundes.

26. Toksikokinetiske data og data om fordeling i væv ved enkelt dosis kan være nok til at bestemme potentialet for akkumulering og/eller persistens. Under visse omstændigheder kan gentagen dosisadministration dog være nødvendig i) for i yderligere detaljer at afdække potentialet for akkumulering og/eller persistens eller ændringer i TK (dvs. enzyminduktion og -inhibition) eller ii) for at opfylde de gældende lovgivningskrav. Hvis et forsøg omfatter gentagen dosering, er det normalt tilstrækkeligt at anvende den lave dosis, men under visse omstændigheder kan det være nødvendigt også at anvende en høj dosis (se også afsnit 57).

**Administration af testkemikalie**

27. Testkemikaliet skal opløses eller suspenderes homogent i det vehikel, der også blev anvendt til de andre toksicitetsforsøg med anvendelse af oral sonde, der er udført med testkemikaliet, hvis oplysninger om vehiklet er tilgængelige. Der gives en begrundelse for valg af vehikel. Valg af vehikel og doseringsvolumen skal være en del af forsøgsdesignet. Testkemikaliet administreres sædvanligvis via sonde. Administration med gelatinekapsler eller iblandet foderet kan være bedre i visse situationer (begrundelse gives i begge tilfælde). Den faktiske dosis, der er administreret til hvert dyr, bekræftes.

28. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen via oral sonde, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse, typen af dosisvehikel, og om dyrene haft adgang til foder inden administration af testkemikaliet. Der gives en begrundelse for administration eller begrænsning af foder inden dosering. Normalt bør volumen holdes så lavt som muligt for både vandige og ikkevandige vehikler. Dosisvolumen må normalt ikke overstige 10 ml/kg kropsvægt for gnavere. Volumen af vehikler, der anvendes i forbindelse med mere lipofile testkemikalier, kan starte ved 4 ml/kg kropsvægt. Når daglig faste er kontraindiceret, bør lavere dosisvolumen (f.eks. 2-4 ml/kg kropsvægt) overvejes ved gentagen dosering. Når det er muligt, bør det overvejes at bruge et dosisvolumen svarende til det, der er anvendt i andre orale sondeforsøg med testkemikaliet.

29. Intravenøs (IV) administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i blod og/eller excreta kan anvendes til at bestemme biotilgængelighed eller relativ oral absorption. Ved et IV-forsøg administreres en enkelt dosis (normalt svarende til, men ikke højere end den laveste orale dosis) af testkemikaliet ved hjælp af et hensigtsmæssigt vehikel. Dette materiale bør administreres i et passende volumen (f.eks. 1 ml/kg kropsvægt) på det valgte administrationssted på mindst fire dyr af det mest egnede køn (begge køn kan anvendes, hvis det er begrundet, se afsnit 16). En fuldt opløst eller suspenderet dosistilberedning er nødvendig ved IV-administration af testkemikaliet.. Vehiklet til IV-administration må ikke opvirke blodintegriteten eller blodgennemstrømningen. Ved infusion af testkemikaliet med en infusionspumpe rapporteres infusionshastigheden, som skal være den samme for

▼M4

alle dyr. Bedøvelse anvendes, hvis et kateter indsættes i halsvenen (til administration af testkemikaliet og/eller udtagning af blod), eller hvis femoralarterien anvendes til administration. Typen af bedøvelse bør overvejes, da den kan påvirke toksikokinetikken. Dyrene skal have mulighed for at restituere sig tilstrækkeligt inden administration af testkemikaliet og vehiklet.

30. Andre administrationsveje, f.eks. dermal applikation og inhalation (se afsnit 74-78), kan anvendes i forbindelse med visse testkemikalier under hensyntagen til deres fysisk-kemiske egenskaber og menneskers forventede anvendelse eller eksponering.

**Målinger**

*Massebalance*

31. Massebalance bestemmes ved at lægge den procentdel af den administrerede (radioaktive) dosis, der udskilles i urin, fæces og udåndet luft, sammen med den procentdel, der er til stede i væv, resten af kadaveret og vaskevand fra bure (se afsnit 46). Generelt vurderes en total genfinding af det administrerede testkemikalie (radioaktivitet) på > 90 % at være tilstrækkelig.

*Absorption*

32. Der kan fås en indledende estimering af absorptionen ved at ekskludere procentdelen af dosen i mave-tarmkanalen og/eller fæces fra bestemmelsen af massebalancen. Se afsnit 33 for oplysninger om beregning af den procentvise absorption. Se afsnit 44-49 for oplysninger om undersøgelse af excreta. Hvis den præcise absorptionsgrad efter oral administration ikke kan bestemmes ud fra massebalanceforsøg (f.eks. hvis mere end 20 % af den administrerede dosis er til stede i fæces), kan yderligere undersøgelser være nødvendige. Disse forsøg kan omfatte enten 1) oral administration af testkemikaliet og måling af testkemikaliet i galde eller 2) oral og intravenøs administration af testkemikaliet og måling af det nettovolumen af testkemikalie, der er til stede i urin plus udåndet luft plus kadaver ved hver af de to administrationsveje. I begge forsøgsdesign foretages måling af radioaktivitet som en surrogatmetode til kemikaliespecifik analyse af testkemikaliet plus metabolitter.

33. Hvis udskillelse i galde undersøges, anvendes oftest oral administration. I dette forsøg lægges et kateter i galdegangen på mindst fire dyr af det mest egnede køn (eller begge køn, hvis det er begrundet), og en enkelt dosis af testkemikaliet administreres. Efter administration af testkemikaliet overvåges udskillelsen af radioaktivitet/testkemikalie i galde så længe som nødvendigt for at anslå den procentdel af den administrerede dosis, der udskilles ad denne vej, og denne værdi kan bruges til direkte at beregne den orale absorptionsgrad:

$$\text{Procent absorption} = \begin{matrix}(\text{mængde i galde} + \text{urin} + \text{udåndet luftqua} \\ + \text{kadaver uden indhold i mave} - \text{tarmkanal} \\ /\text{administreret mængde} \times 100\end{matrix}$$

34. I nogle testkemikalieklasser kan der ske direkte sekretion af den absorberede dosis på tværs af tarmmembraner. I sådanne tilfælde er målingen af den procentvise dosis i fæces efter en oral dosis via kateter i rottens galdekanal ikke repræsentativ for den uabsorberede dosis. Hvis tarmsekretion vurderes at forekomme, anbefales det, at den absorberede procentdel af dosis baseres på den absorption, der beregnes ved at sammenligne udskillelse efter oral administration med udskillelse efter intravenøs administration (intakt rotte eller rotte med kateter i galdekanal) (se afsnit 35). Hvis kvantificering af tarmsekretion vurderes at være nødvendig, bør udskillelse i galdegangen hos rotten med kateter i galdekanalen måles efter intravenøs dosisadministration.

▼M4

*Biotilgængelighed*

35. Biotilgængelighed kan bestemmes ud fra plasma-/blodkinetikken for de orale og intravenøse grupper (se afsnit 50-52) ved hjælp af specifik kemisk analyse af testkemikaliet og/eller relevante metabolitter, og et radioaktivt mærket testkemikalie er derfor ikke påkrævet. Beregningen af testkemikaliets eller relevante metabolitters biotilgængelighed (F) foretages derefter på følgende måde:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_{IV}/Dosis_{exp})$$

hvor AUC er området under koncentration-tidskurven for plasma, og exp er den eksperimentelle administrationsvej (oral, dermal eller via inhalation).

36. I forbindelse med risikovurdering af systemiske virkninger foretrækkes generelt biotilgængelighed af den toksiske komponent generelt frem for den procentvise absorption, når systemiske koncentrationer fra dyreforsøg sammenlignes med analoge bioovervågningsdata fra undersøgelser af erhvervsmæssig eksponering. Situationen kan blive mere kompleks, hvis doserne er i det ikke-lineære område, så det er vigtigt at den toksikokinetiske screening udpeger doser i det lineære område.

*Fordeling i væv*

37. Kendskab til fordelingen i væv af et testkemikalie og/eller dets metabolitter er afgørende for at kunne identificere målvæv og forstå de bagvedliggende toksicitetsmekanismer og for at få oplysninger om testkemikaliets potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Procentdelen af den samlede (radioaktive) dosis i væv og resten af kadaveret bør som minimum måles ved afslutningen af udskillelsesforsøget (f.eks. op til syv dage efter dosis eller mindre afhængigt af testkemikaliets specifikke opførsel). Hvis testkemikalie ikke spores i væv ved forsøgsafslutning (f.eks. fordi testkemikaliet er blevet elimineret inden forsøgsafslutning på grund af en kort halveringstid), bør det omhyggeligt sikres, at data ikke fejlfortolkes. I en sådan situation undersøges fordelingen i væv på det tidspunkt, hvor koncentrationen af testkemikaliet (og/eller dets metabolit) topper i plasma/blod ($T_{max}$), eller hvor udskillelse i urinen topper, alt efter hvad der er relevant (se afsnit 38). Det kan desuden være nødvendigt at indsamle væv på andre tidspunkter med henblik på at bestemme fordelingen i væv af testkemikaliet og/eller dets metabolitter, evaluere betydningen af tid (hvis relevant), hjælpe med at bestemme massebalance og/eller som krævet af en kompetent myndighed. Væv, der indsamles, omfatter lever, fedt, mave-tarmkanal, nyre, milt, fuldblod, resterende kadaver, væv fra målorganer og andet væv (f.eks. skjoldbruskkirtel, erytrocytter, kønsorganer, hud, øjne (især fra pigmenterede dyr) af potentiel signifikans for den toksikologiske evaluering af testkemikaliet. Analyse af yderligere væv på samme tidspunkter bør overvejes for at udnytte dyrene mest muligt, og hvis målorgantoksicitet observeres i forsøg vedrørende subkronisk eller kronisk toksicitet. Den (radioaktive) restkoncentration og forholdet mellem væv og plasma (blod) rapporteres også.

38. Evaluering af fordelingen i væv på flere tidspunkter, f.eks. tidspunktet for spidskoncentration i plasma/blod (dvs. $T_{max}$) eller spidsudskillelse i urin, fremskaffet fra de forskellige forsøg vedrørende plasma-/blodkinetik eller udskillelse, kan også være nødvendig eller kræves af en kompetent myndighed. Disse oplysninger kan bruges til at forstå toksicitet og testkemikaliets potentiale, metabolitakkumulering og persistens. Udvælgelsen af prøver skal begrundes. Prøver til analyse skal generelt være de samme som ovennævnte (se afsnit 37).

▼M4

39. Kvantificering af radioaktivitet til forsøg vedrørende fordeling i væv kan udføres ved hjælp af dissekering, homogenisering, forbrænding og/eller opløsning af organer efterfulgt af væskescintillationstælling af opsamlede rester. Bestemte teknikker, som er på forskellige udviklingstrin, f.eks. kvantitativ helkropsautoradiografi og mikroskopisk autoradiografi af receptor, kan vise sig at være nyttige til bestemmelse af fordelingen af et testkemikalie i organer og/eller væv (3) (4).

40. For andre eksponeringsveje end oral indsamles og analyseres specifikke væv, f.eks. lunger i inhalationsforsøg og hud i dermale forsøg. Se afsnit 74-78.

*Metabolisme*

41. Excreta (og plasma, hvis relevant) indsamles til identifikation og kvantificering af uforandret testkemikalie og uforandrede metabolitter som beskrevet i afsnit 44-49. Pooling af excreta med henblik på at lette identifikationen af metabolitter i en bestemt dosisgruppe accepteres. Det anbefales, at metabolitter fra hver tidsperiode profileres. Hvis det ikke er muligt på grund af manglende prøver og/eller radioaktivitet, kan pooling af urin og fæces på tværs af flere tidspunkter accepteres, men pooling på tværs af køn eller doser accepteres ikke. Der anvendes hensigtsmæssige kvalitative og kvantitative metoder til at analysere urin, fæces, udåndet radioaktivitet fra behandlede dyr og galde, hvis det er relevant.

42. Der bør ydes en rimelig indsats for at identificere alle metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, og fastlægge et metabolisk system for testkemikaliet. Testkemikalier, der er karakteriseret i excreta som bestående af 5 % eller mere af den administrerede dosis, identificeres. Identifikation betyder den præcise strukturelle bestemmelse af komponenter. Identifikation opnås typisk ved at bruge co-kromatografi af metabolitten med kendte standarder ved hjælp af to forskellige systemer eller ved at bruge teknikker, der kan foretage positiv strukturel identifikation, som f.eks. massespektroskopi, kernemagnetisk resonans (NMR) osv. Hvis co-kromatografi anvendes, kan kromatografiske teknikker, der anvender samme stationære fase med to forskellige opløsningsmiddelsystemer, ikke anvendes til at foretage verifikation af metabolitidentitet ved hjælp af to teknikker, da metoderne ikke er uafhængige. Identifikation ved hjælp af co-kromatografi foretages ved hjælp af to forskellige og analytisk uafhængige systemer, f.eks. tyndtlagskromatografi (reverse og normal fase) (TLC) og højtydende væskekromatografi (HPLC). Hvis den kromatografiske adskillelse er af passende kvalitet, er yderligere bekræftelse ved hjælp af spektroskopi ikke nødvendig. Alternativt kan entydig identifikation også opnås ved at bruge metoder, der frembringer strukturelle oplysninger, som f.eks. væskekromatografi-massespektroskopi (LC-MS) eller væskekromatografi/tandem massespektroskopi (LC-MS/MS), gaskromatografi/massespektroskopi (GC-MS) og NMR-spektrometri.

43. Hvis identifikation af metabolitter, der udgør 5 % eller mere af den administrerede dosis, ikke er mulig, gives der en begrundelse/forklaring i den endelige rapport. Det kan være hensigtsmæssigt at identificere metabolitter, som udgør mindre end 5 % af den administrerede dosis, for at få en bedre forståelse af metaboliseringsvejen i forbindelse med fare- og/eller risikovurderingen af testkemikaliet. Strukturel bekræftelse skal så vidt muligt gives. Det kan omfatte profilering i plasma eller blod eller andet væv.

▼M4

*Udskillelse*

44. Hastigheden og graden af udskillelse af den administrerede dosis bestemmes ved at måle den procentdel af dosen (radioaktiv), der er genfundet i urin, fæces og udåndet luft. Disse data vil også medvirke til at bestemme massebalance. De testkemikaliekvantiteter (radioaktivitet), der er elimineret i urin, fæces og udåndet luft, bestemmes med passende tidsintervaller (se afsnit 47-49). Forsøg med gentagne doser designes, så data om udskillelse kan indsamles med henblik på at opfylde målene i afsnit 26. Derved kan forsøgene sammenlignes med enkeltdosisforsøg.

45. Hvis et pilotforsøg har vist, at der ikke udskilles en signifikant mængde af testkemikaliet (radioaktivitet) (i henhold til afsnit 49) gennem udåndet luft, er det ikke nødvendigt at indsamle udåndet luft i hovedforsøget.

46. Hvert dyr placeres i et separat metabolismebur med henblik på indsamling af excreta (urin, fæces og udåndet luft). Efter hver indsamlingsperiode (se afsnit 47-49) skylles metabolismeburene med opløsningsmiddel (»burvask«) for at sikre maksimal genfinding af testkemikaliet (radioaktivitet). Indsamlingen af excreta afsluttes på dag 7, eller når mindst 90 % af den administrerede dosis er genfundet, alt efter hvad der forekommer først.

47. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i urin bestemmes på mindst to tidspunkter på den første indsamlingsdag, hvoraf det ene skal være 24 timer efter dosering, og derefter dagligt indtil forsøgsafslutning. Der bør vælges mere end to indsamlingspunkter på dag 1 (f.eks. ved 6, 12 og 24 timer). Resultaterne af pilotforsøg analyseres for oplysninger om alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af indsamlingstidsplan.

48. De samlede mængder af testkemikaliet (radioaktivitet) i fæces bestemmes dagligt fra og med 24 timer efter dosering indtil forsøgsafslutning, medmindre pilotforsøg påviser alternative eller yderligere indsamlingstidspunkter. Der gives en begrundelse for valg af alternative indsamlingstidsplaner.

49. Indsamlingen af udåndet $CO_2$ og andre flygtige materialer kan afbrydes i et forsøg, hvis mindre end 1 % af den administrerede dosis findes i den udåndede luft i løbet af en indsamlingsperiode på 24 timer.

**Forsøg vedrørende tidsforløb**

*Plasma-/blodkinetik*

50. Formålet med disse forsøg er at opnå estimater af grundlæggende TK-parametre [f.eks. $C_{max}$, $T_{max}$, halveringstid ($t_{1/2}$), AUC] for testkemikaliet. Disse forsøg kan gennemføres med en dosis eller mere sandsynligt med to eller flere doser. Dosis fastlægges ud fra karakteren af forsøget og/eller det undersøgte væv. Der skal evt. bruges kinetiske data til at afklare spørgsmål, som f.eks. testkemikaliets biotilgængelighed, og/eller afklare virkningen af dosen på clearance (f.eks. at afklare, om clearance mættes på en dosisafhængig måde).

51. Til disse forsøg anvendes der mindst fire dyr pr. køn pr. dosisgruppe. Der gives en begrundelse for kønnet af de valgte dyr. Det bør overvejes at bruge begge køn (4 handyr og 4 hundyr), hvis der foreligger beviser, som understøtter signifikante kønsrelaterede forskelle i toksicitet.

▼M4

52. Efter administration af testkemikaliet (radioaktivt mærket) udtages blodprøver fra hvert dyr på passende tidspunkter ved hjælp af en hensigtsmæssig prøveudtagningsteknik. Volumenet og antallet af blodprøver, der kan udtages pr. dyr, kan være begrænset af potentielle virkninger af gentagen prøvetagning på dyrets sundhed/fysiologi og/eller analysemetodens sensitivitet. Prøver analyseres for hvert enkelt dyr. Under visse omstændigheder (f.eks. karakterisering af metabolitter) kan det være nødvendigt at samle prøver fra flere dyr i en pool. Poolede prøver identificeres tydeligt, og der gives en forklaring. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, kan analysen af total tilstedeværende radioaktivitet være tilstrækkelig. I så fald analyseres den totale radioaktivitet i fuldblod og plasma eller plasma og røde blodlegemer, således at blod-/plasmaforholdet kan beregnes. Under andre omstændigheder kan mere specifikke undersøgelser, der kræver identifikation af moderstof og/eller metabolitter eller vurdering af proteinbinding, være nødvendige.

*Kinetik for andet væv*

53. Formålet med disse forsøg er at fremskaffe oplysninger om tidsforløb for at afklare spørgsmål vedrørende f.eks. toksisk virkningsmåde, bioakkumulering og biopersistens via bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i forskellige væv. Valget af væv og antallet af tidspunkter, der evalueres, afhænger af det undersøgte væv og den toksikologiske database for testkemikaliet. Designet af disse kinetiske forsøg vedrørende andet væv baseres på information fremskaffet som beskrevet i afsnit 37-40. Forsøgene kan omfatte enkeltdosering eller gentagen dosering. Der gives en detaljeret begrundelse for den valgte tilgang.

54. Årsagerne til at udføre kinetiske forsøg med andet væv kan omfatte:

— bevis for forlænget halveringstid i blod, hvilket antyder mulig akkumulering af testkemikaliet i forskellige væv

— ønske om at undersøge, om der er opnået et steady state-niveau i bestemte væv (i forsøg med gentagen dosering, hvor der er opnået et tilsyneladende steady state-niveau for testkemikaliet i blod, kan man f.eks. også ønske at bekræfte, at der er opnået et steady state-niveau i målvæv).

55. For disse typer forsøg vedrørende tidsforløb administreres en passende dosis af testkemikaliet til mindst fire dyr pr. dosis pr. tidspunkt, og tidsforløbet for fordelingen i de udvalgte vævstyper overvåges. Der anvendes kun ét køn, medmindre der observeres kønsspecifik toksicitet. Om total radioaktivitet eller moderstof og/eller metabolitter analyseres, afhænger af det undersøgte spørgsmål. Fordeling i væv vurderes ved hjælp af hensigtsmæssige teknikker.

*Enzyminduktion/-inhibition*

56. Forsøg, der omhandler de mulige virkninger af enzyminduktion/-inhibition eller biotransformation af testkemikaliet i løbet af forsøget, kan være nødvendige i følgende tilfælde:

1) Tilgængelige beviser indicerer en sammenhæng mellem testkemikaliets biotransformation og øget toksicitet.

2) De tilgængelige toksicitetsdata indicerer en ikke-lineær sammenhæng mellem dosis og metabolisme.

▼M4

3) Resultaterne af forsøg vedrørende identifikation af metabolitter påviser en potentielt toksisk metabolit, der muligvis er blevet produceret af en enzymbane, der er induceret af testkemikaliet.

4) Til forklaring af virkninger, der påstås at hænge sammen med enzyminduktionsfænomener.

5) Hvis toksikologisk signifikante forandringer i testkemikaliets metaboliske profil observeres via in vitro- eller in vivo-eksperimenter med forskellige arter eller under forskellige betingelser, skal de involverede enzymer muligvis karakteriseres (f.eks. fase I-enzymer, som f.eks. isoenzymer af det cytochrom P450-afhængige monooxygenasesystem, fase II-enzymer, som f.eks. isoenzymer af sulfotransferase eller uridindiphosphat-glucuronosyltransferase, eller andre relevante enzymer). Disse oplysninger kan bruges til at evaluere relevansen af ekstrapolering mellem arter.

57. Der skal anvendes hensigtsmæssige forsøgsprotokoller med passende validering og begrundelse til at evaluere ændringer i TK relateret til testkemikaliet. Eksempler på forsøgsdesign omfatter gentagen dosering med ikkemærket testkemikalie efterfulgt af en enkelt radioaktivt mærket dosis på dag 14 eller gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie og prøvetagning på dag 1, 7 og 14 med henblik på at bestemme metabolitprofiler. Gentagen dosering med radioaktivt mærket testkemikalie kan også give oplysninger om bioakkumulering (se afsnit 26).

SUPPLERENDE TILGANGE

58. Supplerende tilgange ud over de in vivo-forsøg, der er beskrevet i denne testmetode, kan give nyttige oplysninger om absorption, fordeling, metabolisme eller eliminering af et testkemikalie i visse arter.

**Anvendelse af in vitro-oplysninger**

59. Flere spørgsmål om metabolismen af testkemikaliet kan undersøges i in vitro-forsøg baseret på hensigtsmæssige testsystemer. Nyligt isolerede eller dyrkede hepatocytter og subcellulære fraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol- eller S9-fraktion) fra leveren kan bruges til at studere mulige metabolitter. Lokal metabolisme i målorganet, f.eks. lunge, kan være interessant i forbindelse med risikovurdering. Til sådanne formål kan mikrosomfraktioner af målvæv være anvendelige. Forsøg med mikrosomer kan bruges til at undersøge potentielle køns- og livsfaseforskelle og karakterisere enzymparametre ($K_m$ og $V_{max}$), som kan medvirke til at vurdere dosisafhængigheden af metabolisme i forhold til eksponeringsniveauer. Mikrosomer kan desuden hjælpe med at identificere de specifikke mikrosomenzymer, der er involveret i metabolismen af testkemikaliet, hvilket kan være relevant ved ekstrapolering mellem arter (se også afsnit 56). Potentialet for induktion af biotransformation kan også undersøges ved hjælp af subcellulære leverfraktioner (f.eks. mikrosomer og cytosol) fra dyr, der på forhånd er behandlet med det undersøgte testkemikalie, in vitro via forsøg med hepatocytinduktion eller fra specifikke cellelinjer, der udtrykker relevante enzymer. Under visse omstændigheder og hensigtsmæssige forhold kan det overvejes at anvende sub-cellulære fraktioner af menneskeligt væv til at bestemme potentielle artsforskelle, hvad angår biotransformation. Resultaterne af in vitro-undersøgelser kan også bruges til at udvikle PBTK-modeller (5).

▼M4

60. In vitro-forsøg vedrørende dermal absorption kan give yderligere oplysninger, som kan karakterisere absorption (6).

61. Primære cellekulturer fra leverceller og friske vævsudsnit kan anvendes til at undersøge samme spørgsmål som levermikrosomer. I nogle tilfælde kan specifikke spørgsmål besvares ved hjælp af cellelinjer med defineret udtryk af det relevante enzym eller ved hjælp af konstruerede cellelinjer. I nogle tilfælde kan det være nyttigt at undersøge inhibitionen og induktionen af specifikke cytochrom P450-isozymer (f.eks. CYP1A1, 2E1, 1A2 m.fl.) og/eller fase II-enzymer af moderstoffet ved hjælp af in vitro-forsøg. De indhentede informationer kan bruges i forbindelse med stoffer med tilsvarende struktur.

**Brug af toksikokinetiske data fra toksicitetsforsøg som supplerende oplysninger**

62. Analyse af blod-, vævs- eller excretaprøver fremskaffet i forbindelse med gennemførelsen af andre toksicitetsforsøg kan tilvejebringe data om biotilgængelighed, ændringer i plasmakoncentration over tid (AUC, $C_{max}$), bioakkumuleringspotentiale, clearance-hastigheder og køns- eller livsfasebetingede ændringer i metabolisme og kinetik.

63. Overvejelsen af forsøgsdesignet kan omfatte besvarelse af spørgsmål vedrørende: mætning af absorptions-, biotransformations eller udskillelsesveje ved højere dosisniveauer, funktionen af nye metaboliske veje ved højere doser og begrænsningen af toksiske metabolitter til højere doser.

64. Andre overvejelser i forbindelse med farevurdering kan omfatte spørgsmål, som f.eks.:

— aldersrelateret sensitivitet som følge af forskelle i blod-hjernebarrierens tilstand samt nyre- og eller detoksificeringskapaciteten

— sensitivitet for delpopulation som følge af forskelle i biotransformationskapacitet eller andre TK-forskelle

— grad af eksponering af foster ved transplacental overførsel af kemikalier eller af den nyfødte via laktation.

**Brug af toksikokinetisk modellering**

65. Toksikokinetiske modeller kan bruges til forskellige formål i forbindelse med fare- og risikovurdering, som f.eks. forudsigelse af systemisk eksponering og intern vævsdosis. Specifikke spørgsmål vedrørende virkningsmåde kan undersøges, og disse modeller kan danne grundlaget for ekstrapolering på tværs af arter, eksponeringsveje, doseringsmønstre og risikovurdering for mennesker. Data, som kan bruges til at udvikle PBTK-modeller for et testkemikalie for en given art, omfatter 1) fordelingskoefficienter, 2) biokemiske konstanter og fysiologiske parametre, 3) absorptionsparametre, der er specifikke for eksponeringsvejen, og 4) kinetiske in vivo-data til modelevaluering [f.eks. clearanceparametre for relevante (> 10 %) udskillelsesveje samt $K_m$ og $V_{max}$ for metabolisme]. De forsøgsdata, der bruges i forbindelse med modeludvikling, skal genereres med videnskabeligt forsvarlige metoder, og modelresultaterne skal evalueres. Parametre, der er specifikke for testkemikaliet og arten, f.eks. absorptionshastigheder og konstanter for fordeling mellem blod/væv og metabolisk hastighed, bestemmes ofte for at lette udvikling af generelle eller fysiologisk baserede modeller (7).

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

66. Forsøgsrapporten bør indeholde en indholdsfortegnelse.

**Selve rapporten**

67. Selve rapporten skal indeholde de oplysninger, der er omfattet af denne testmetode, opdelt i følgende kapitler og afsnit:

*Resumé*

68. Dette afsnit af forsøgsrapporten skal indeholde et resumé af forsøgsdesignet og en beskrivelse af de anvendte metoder. I afsnittet fremhæves også de centrale fund med hensyn til massebalance, karakter og omfang af metabolitter, vævsrester, clearance-hastighed, bioakkumuleringspotentiale, kønsbetingede forskelle osv. Resuméet skal være så detaljeret, at fundene kan evalueres.

*Indledning*

69. I dette afsnit af rapporten anføres forsøgsmål, -rationale og -design, og der gives relevante referencer og baggrundsoplysninger.

*Materialer og metoder*

70. Dette afsnit i rapporten skal indeholde detaljerede beskrivelser af alle relevante forhold, herunder:

a) Testkemikalie

I dette underafsnit identificeres testkemikaliet: kemisk navn, molekylærstruktur, kvalitativ og kvantitativ bestemmelse af dets kemiske sammensætning, kemisk renhed, samt type og kvantiteter af evt. urenheder, hvis det er muligt. Det skal også indeholde oplysninger om fysisk-kemiske egenskaber, herunder fysisk tilstand, farve, opløselighed og/eller fordelingskoefficient, stabilitet og ætsende virkning, hvis det er relevant. Hvis det er relevant, anføres oplysninger om isomere. Hvis testkemikaliet er radioaktivt mærket, anføres følgende oplysninger om følgende i dette underafsnit: radionukleidtype, mærkets placering, specifik aktivitet og radiokemisk renhed.

Evt. vehikel, fortyndingsmidler, suspensionsmidler og blødgøringsmidler eller andre materialer, der anvendes til administration af testkemikaliet, anføres eller beskrives.

b) Forsøgsdyr

I dette afsnit anføres oplysninger om forsøgsdyrene, herunder udvælgelse af og begrundelse for art, stamme og alder ved forsøgets begyndelse, køn samt kropsvægt, sundhedsstatus og dyreopdræt og -sundhed.

c) Metoder

Dette afsnit skal indeholde detaljer om det anvendte forsøgsdesign og de anvendte metoder. Det skal bl.a. indeholde:

1) en begrundelse for evt. ændring af eksponeringsvej og eksponeringsbetingelser

▼M4

2) en begrundelse for valget af dosisniveauer

3) en beskrivelse af evt. pilotforsøg, der er indgår i forsøgsdesignet for de opfølgende forsøg; baggrundsdata for pilotforsøg indgives

4) en beskrivelse af tilberedningen af doseringsopløsningen og typen af evt. opløsningsmiddel eller vehikel

5) antal behandlingsgrupper og dyr i hver gruppe

6) dosisniveauer og -volumen (og dosens specifikke aktivitet, når radioaktivitet anvendes)

7) administrationsveje og -metoder

8) doseringshyppighed

9) evt. fasteperiode

10) total radioaktivitet pr. dyr

11) håndtering af dyr

12) prøvetagning og -håndtering

13) analysemetoder anvendt til separation, kvantificering og identifikation af metabolitter

14) påvisningsgrænse for de anvendte metoder

15) andre anvendte forsøgsmålinger og -fremgangsmåder (herunder validering af metoder til metabolitanalyse).

d) Statistisk analyse:

Hvis statistisk analyse bruges til at analysere forsøgsfund, skal rapporten indeholde tilstrækkelige oplysninger om den anvendte analysemetode og det anvendte computerprogram, således at en uafhængig reviewer/statistiker kan revurdere og gentage analysen.

Hvis der bruges systemer, som modellerer forsøg, som f.eks. PBTK, skal præsentationen af modeller indeholder en udførlig beskrivelse af modellen, således at der kan foretages en uafhængig gentagelse og validering af modellen (se afsnit 65 og tillæg: Definitioner).

*Resultater*

71. Alle data opsummeres og opstilles i tabelform med relevant statistisk evaluering og beskrives i afsnittets tekst. Data om radioaktivitetsmåling opsummeres og fremlægges, for så vidt det er relevant for forsøget, typisk som mikrogram- eller milligram-ækvivalenter pr. prøvemasse, men andre enheder kan anvendes. I dette afsnit indsættes grafiske illustrationer af fundene, reproduktioner af repræsentative kromatografi- og spektrometridata, identifikation/kvantificering af metabolitter og foreslåede metaboliske veje, herunder metabolitternes molekylærstruktur. Følgende oplysninger angives desuden i dette afsnit, for så vidt de er relevante:

1) kvantitet og procentdel af genfunden radioaktivitet i urin, fæces, udåndet luft samt urin og fæces i vaskevand fra bure

— I forbindelse med dermale forsøg angives også data om genfinding af testkemikaliet fra behandlet hud, hudvask og tilbageværende radioaktivitet i hudbeskyttelse og metabolismebur samt resultater af forsøg med hudvask. Se afsnit 74-77 for en yderligere diskussion.

▼M4

— I forbindelse med inhalationsforsøg anføres også data om genfinding af testkemikaliet i lunger og nasale væv (8). Se afsnit 78 for en yderligere diskussion

2) fordeling i væv rapporteret som procentdel af administreret dosis og koncentration (mikrogram-ækvivalenter pr. g væv), og forhold mellem væv og blod eller væv og plasma

3) materialebalance udviklet fra hvert forsøg, der omfatter analyse af kropsvæv og excreta

4) plasmakoncentrationer og toksikokinetiske parametre (biotilgængelighed, AUC, Cmax, Tmax, clearance og halveringstid) efter administration via de relevante eksponeringsveje

5) hastighed og grad af absorption af testkemikaliet efter administration via de relevante eksponeringsveje

6) kvantiteter af testkemikaliet og metabolitter (rapporteret som en procentdel af den administrerede dosis) indsamlet i excreta

7) reference til data i tillæg, der indeholder data om individuelle dyr for alle undersøgte effektparametre (f.eks. dosisadministration, genfunden procent, koncentrationer, TK-parametre osv.)

8) illustration af de foreslåede metaboliske veje og metabolitternes molekylærstruktur.

*Diskussion og konklusioner*

72. I dette afsnit skal forfatterne:

1) anføre en foreslået metabolisk vej baseret på resultaterne af metabolismen og elimineringen af testkemikaliet

2) diskutere potentielle arts- og kønsspecifikke forskelle med hensyn til testkemikaliets eliminering og/eller biotransformation

3) opstille data om og diskutere identifikationen og omfanget af metabolitter, clearance-hastigheder, bioakkumuleringspotentiale og koncentration af moderstof- og/eller metabolitrester i væv samt mulige dosisbetingede ændringer i TK-parametre, for så vidt det er relevant

4) i dette afsnit anføre alle relevante TK-data indhentet i forbindelse med gennemførelsen af toksicitetsforsøg

5) angive en præcis konklusion, der underbygges af forsøgsfundene

6) efter behov indsætte yderligere relevante afsnit.

73. I yderligere afsnit indsættes understøttende bibliografiske oplysninger, tabeller, figurer, tillæg osv.

▼M4

ALTERNATIVE EKSPONERINGSVEJE

**Dermal**

*Dermal behandling*

74. I dette afsnit gives der specifikke oplysninger om undersøgelsen af toksikokinetikken for testkemikaliet ved dermal eksponering. Med hensyn til dermal absorption henvises der til kapitel B.44 i dette bilag [Hudabsorption: in vivo-metode (9)]. I forbindelse med andre effektparametre, f.eks. fordeling og metabolisme, kan denne testmetode B.36 anvendes. Der anvendes et eller flere dosisniveauer ved dermal behandling. Testkemikaliet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Dosisniveauer vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Faktorer, der kan tages i betragtning ved valg af dermal dosis, omfatter forventet human eksponering og/eller doser, hvor toksicitet er observeret i andre forsøg vedrørende dermal toksicitet. De dermale doser skal om nødvendigt opløses i et egnet vehikel og påføres i en mængde, der er tilstrækkelig til at levere doserne. Kort før forsøget indledes, klippes forsøgsdyrene på ryggen. Såfremt pelsen barberes bort, bør det ske ca. 24 timer, inden forsøget indledes. Under denne procedure må man passe på ikke at beskadige huden, da det kan ændre dens permeabilitet. Mindst 10 % af kroppens overflade skal gøres klar til påføring af testkemikaliet. I tilfælde af stærkt toksiske kemikalier kan området være mindre end 10 %, men en så stor del af området som muligt bør dækkes med et tyndt og ensartet lag. Det samme behandlingsområde anvendes til alle dermale testgrupper. De behandlede områder beskyttes med en passende kappe, som fastgøres. Dyrene anbringes enkeltvis i bure.

75. Der gennemføres et forsøg med hudvask med henblik på at vurdere den mængde, af den anvendte dosis af testkemikaliet, der kan fjernes fra huden ved at vaske det behandlede hudområde med mild sæbe og vand. Dette forsøg kan også hjælpe med at bestemme massebalancen, når testkemikaliet administreres ved dermal applikation. I dette forsøg med hudvask påføres en enkelt dosis af testkemikaliet på to dyr. Dosis vælges i overensstemmelse med afsnit 23 i denne testmetode (se også afsnit 76 for en diskussion af hudkontakttid). De mængder af testkemikaliet, der genfindes i vaskevandet, bestemmes med henblik på at vurdere, hvor effektivt testkemikaliet fjernes ved vask.

76. Medmindre det ikke er muligt på grund af ætsning, påføres testkemikaliet huden og forbliver der i mindst seks timer. Når beskyttelseskappen fjernes, vaskes det behandlede område ved hjælp af den fremgangsmåde, der er beskrevet i forsøget med hudvask (se afsnit 75). Både beskyttelseskappe og vaskevand analyseres for rester af testkemikaliet. Ved afslutningen af forsøgene aflives alle dyrene humant i overensstemmelse med (2), og den behandlede hud fjernes. Et relevant udsnit af den behandlede hud analyseres for rester af testkemikaliet (radioaktivitet).

77. I forbindelse med toksikokinetisk vurdering af lægemidler kan der i overensstemmelse med den gældende lovgivning anvendes forskellige fremgangsmåder.

▼M4

**Inhalation**

78. Der anvendes en enkelt koncentration (eller flere, hvis det er nødvendigt) af testkemikaliet. Koncentrationerne vælges i overensstemmelse med afsnit 20-26 i denne testmetode. Inhalationsbehandlinger gennemføres ved hjælp af et apparat med en »næsekegle« eller anordning til behandling af kun hovedet for at forhindre absorption via andre eksponeringsveje (8). Hvis andre betingelser for inhalationseksponering anvendes, dokumenteres begrundelsen for ændringen. Varigheden af eksponering ved inhalation defineres. Eksponeringsvarigheden er typisk 4-6 timer.

*LITTERATUR:*

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Kapitel B.45 i dette bilag, Hudabsorption: in vitro-metode.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No. 9. Genève, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Kapitel B.44 i dette bilag, Hudabsorption: in vivo-metode.

(10) Barton HA, et al. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M og Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

*Tillæg*

DEFINITIONER

**Absorption**: proces(ser) for optagelse af kemikalier i eller på tværs af væv. Absorption henviser til moderstoffet og alle dets metabolitter. Må ikke forveksles med »biotilgængelighed«.

**Akkumulering** (bioakkumulering): Forøgelse af mængden af et testkemikalie over tid i væv (normalt fedtvæv, efter gentagen eksponering); hvis tilførslen af et testkemikalie til kroppen er større end den hastighed, hvormed det elimineres, akkumulerer organismen testkemikaliet, og der kan opnås toksiske koncentrationer af et testkemikalie.

**ADME**: akronym for »Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion« (absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse«.

**AUC**: (område under koncentration-tidskurven for plasma): området under kurven i et diagram over koncentrationen af et testkemikalie i plasma over tid. Det repræsenterer den samlede mængde af testkemikaliet, der absorberes af kroppen i en fastsat periode. Under lineære betingelser er AUC (fra nultid til uendeligt) proportional med den samlede mængde af testkemikaliet, der absorberes af kroppen, uanset absorptionshastighed.

**Autoradiografi**: (helkropsautoradiografi): bruges til kvalitativt eller kvantitativt at lokalisere et radioaktivt testkemikalie i væv. I denne teknik anvendes røntgenfilm og nu også digital fosfor-imaging til at visualisere radioaktivt mærkede molekyler eller fragmenter af molekyler ved at registrere den stråling, der udsendes fra det undersøgte objekt. Kvantitativ helkropsautoradiografi har visse fordele sammenlignet med organdissekering, hvad angår evaluering af testkemikaliets fordeling og vurderingen af den samlede genfinding og opløsning af radioaktivt materiale i væv. Det er f.eks. en vigtig fordel, at teknikken kan bruges i forbindelse med pigmenterede dyremodeller til at vurdere en mulig sammenhæng mellem testkemikaliet og melanin, som kan binde visse molekyler. Teknikken kan give anvendelige helkropsbilleder af bindingssteder med høj kapacitet/lav affinitet, men den kan være mindre effektiv til at genkende specifikke steder, som f.eks. receptorbindingssteder, hvor detektering kræver relativt høj opløsning og sensitivitet. Når autoradiografi anvendes, gennemføres forsøg med henblik på at bestemme massebalancen af det administrerede stof som en separat gruppe eller i et forsøg, der er adskilt fra forsøget vedrørende fordeling i væv, hvor alle excreta (herunder evt. også udåndet luft) og hele kadavre homogeniseres og analyseres ved hjælp af væskescintillationstælling.

**Udskillelse via galde**: Udskillelse via galdegangen.

**Bioakkumulering**: se »Akkumulering«.

**Biotilgængelighed**: fraktion af den administrerede dosis, der når det systemiske kredsløb eller gøres tilgængeligt på stedet for fysiologisk aktivitet. Normalt henviser biotilgængeligheden af et testkemikalie til moderstoffet, men kan også henvise til dets metabolit. Det vedrører kun én kemisk form. *Bemærk:* Biotilgængelighed og absorption er ikke det samme. Forskellen mellem f.eks. oral absorption (dvs. tilstedeværelse i tarmvæg og portalkredsløb) og biotilgængelighed (dvs. tilstedeværelse i systemisk blod og væv) kan opstå ved kemisk nedbrydning som følge af bl.a. metabolisme i tarmvæg eller transport af efflux tilbage til tarmlumen eller præsystemisk metabolisme i leveren (10). Biotilgængelighed af den toksiske komponent (moderstof eller en metabolit) er en afgørende parameter, når en intern værdi af den eksterne NOAEL eller BMD (anvendt dosis) skal udledes i forbindelse med vurdering af risiko for mennesker (ekstrapolering fra høj til lav dosis eller ekstrapolering mellem administrationsveje). I forbindelse med levervirkninger efter oral administration er oral absorption tilstrækkelig. For alle andre virkninger end ved indgangsstedet er biotilgængelighed generelt en mere pålidelig parameter til brug i risikovurdering end absorption.

▼M4

**Biopersistens**: se »Persistens«.

**Biotransformation**: kemisk (enzym)omdannelse af et undersøgt testkemikalie til et andet kemikalie i kroppen. Synonymt med »metabolisme«.

**$C_{max}$**: enten maksimal (spids)koncentration af blod (plasma/serum) efter administration eller maksimal (spids)udskillelse (i urin eller fæces) efter administration.

**Clearance-hastighed**: kvantitativ måling af den hastighed, hvormed et testkemikalie fjernes fra blod, plasma eller et bestemt væv pr. tidsenhed.

**Rum**: strukturel eller biokemisk del (eller enhed) af en krop, et væv eller en celle, der er adskilt fra resten.

**Afgiftningsveje**: serie af trin, der fører til eliminering af toksiske kemikalier i kroppen, enten ved metabolisk ændring eller udskillelse.

**Fordeling**: spredning af et testkemikalie og dets afledte stoffer i en organisme.

**Enzymer/isozymer**: proteiner, der katalyserer kemiske reaktioner. Isozymer er enzymer, der katalyserer lignende kemiske reaktioner, men som har en anden aminosyresekvens.

**Enzymparametre**: $K_m$: Michaelis-konstant og $V_{max}$: maksimal velocitet.

**Udskillelse**: proces(ser), hvorved et administreret testkemikalie og/eller dets metabolitter fjernes fra kroppen.

**Eksogent**: indført fra eller produceret uden for organismen eller systemet.

**Ekstrapolering**: følgeslutning af en eller flere ukendte værdier på grundlag af det, der er kendt, eller som er observeret.

**Halveringstid ($t_{1/2}$)**: den tid, der går, inden koncentrationen af testkemikaliet er reduceret til det halve i et rum. Værdien henviser typisk til koncentrationen i plasma eller mængden af testkemikaliet i hele kroppen.

**Induktion/enzyminduktion**: enzymsyntese som respons på miljøpåvirkende eller inducerende molekyle.

**Linearitet/lineær kinetik**: En proces, der er lineær med hensyn til kinetik, når alle overførselshastigheder mellem rum er proportionale med de tilstedeværende mængder eller koncentrationer, dvs. første orden. Som følge deraf er clearance- og fordelingsvolumener konstante, og det samme gælder halveringstid. De opnåede koncentrationer er proportionale med doseringshastigheden (eksponering), og akkumulering er mere forudsigelig. Linearitet/ikke-linearitet kan vurderes ved at sammenligne relevante parametre, f.eks. AUC, efter forskellige doser eller efter enkelt og gentagen eksponering. Manglende dosisafhængighed kan indicere mætning af de enzymer, der er involveret i metabolismen af stoffet. En forøgelse af AUC efter gentagen eksponering sammenlignet med enkelt eksponering kan indicere inhibition af metabolisme, og en reduktion i AUC kan indicere induktion af metabolisme [se også (11)].

**Massebalance**: opgørelse af det testkemikalie, der tilføres og forlader systemet.

**Materialebalance**: se »Massebalance«.

▼M4

**Toksicitetsmekanisme (-måde)/virkningsmekanisme (-måde)**: virkningsmekanisme er specifikke biokemiske interaktioner, gennem hvilke et testkemikalie producerer sin virkning. Virkningsmåde henviser til mere generelle veje, der fører til et testkemikalies toksicitet.

**Metabolisme**: synonymt med »biotransformation«.

**Metabolitter**: produkter af metabolisme eller metaboliske processer.

**Oral absorption**: den procentdel af dosen af testkemikalie, der absorberes fra administrationsstedet (f.eks. mave-tarmkanalen). Denne kritiske parameter kan bruges til at bestemme den fraktion af det administrerede testkemikalie, der når portalvenen og efterfølgende leveren.

**Fordelingskoefficient**: kaldes også distributionskoefficienten og er et mål for et kemikalies differentierede opløselighed i to opløsningsmidler.

**Peak-niveau i blod (plasma/serum)**: Maksimal (spids)koncentration i blod (plasma/serum) efter administration (se også »$C_{max}$«).

**Persistens (biopersistens)**: Langvarig tilstedeværelse af et kemikalie (i et biologisk system) som følge af resistens mod nedbrydning/eliminering.

**Analogislutning**: information om effektparameter for et eller flere kemikalier bruges til at forudsige effektparameteren for målkemikaliet.

**Mikroskopisk autoradiografi af receptor** (eller Mikroautoradiografi af receptor): denne teknik kan bruges til at undersøge xenobiotisk interaktion med bestemte vævssteder eller cellepopulationer, f.eks. i forsøg vedrørende receptorbinding eller specifikke virkningsmåder, der kræver høj opløsning og høj sensitivitet, som ikke kan opnås med andre teknikker, som f.eks. helkropsautoradiografi.

**Administrationsvej** (oral, intravenøs, dermal, inhalation osv.): henviser til den måde, hvorpå kemikalier indgives i kroppen (f.eks. oralt med mavesonde, oralt via foderet, dermalt, ved inhalation, intravenøst osv.).

**Mætning**: tilstand, hvorved en eller flere af de kinetiske processer (f.eks. absorption, metabolisme eller clearance) er på deres højeste (dvs. »mættede«).

**Sensitivitet**: en metode eller et instruments evne til at skelne mellem måleresultater, som repræsenterer forskellige niveauer af en undersøgt variabel.

**Steady state-niveau i blod (plasma)**: ikke-ligevægtstilstand for et åbent system, hvor alle kræfter, der påvirker systemet, præcist opvejes af modsatte kræfter på en sådan måde, at alle dets komponenter er stationære i koncentration, selv om stoffet strømmer gennem systemet.

**Systemmodellering** (fysiologibaseret toksikokinetisk, farmakokinetisk, fysiologibaseret farmakokinetisk, biologisk osv.): abstrakt model, der bruger matematisk sprog til at beskrive systemets funktion.

**Målvæv**: væv, hvor den primære skadelige virkning af en toksikant manifesteres.

▼M4

**Testkemikalie**: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

**Fordeling i væv**: reversibel bevægelse af et testkemikalie fra et sted i kroppen til et andet. Fordeling i væv kan undersøges ved hjælp af organdissekering, homogenisering, forbrænding og væskescintillationstælling eller kvalitativ og/eller kvantitativ helkropsautoradiografi. Førstnævnte kan bruges til at fremskaffe oplysninger om koncentration og genfunden procentdel i væv og resten af kadaveret af de samme dyr, men ikke oplysninger om opløsning for alle væv, og kan have en samlet genfinding, der er mindre end ideel (< 90 %). Se definitionen af sidstnævnte ovenfor.

$\mathbf{T_{max}}$: tid til at nå $C_{max}$.

**Toksikokinetik** (farmakokinetik): undersøgelse af absorption, fordeling, metabolisme og udskillelse af kemikalier over tid.

**Validering af modeller**: proces, hvor det vurderes, om en model er egnet til ensartet at beskrive de tilgængelige toksikokinetiske data. Modeller kan evalueres ved statistisk og visuelt at sammenligne modelforudsigelser med forsøgsværdier i forhold til en fælles uafhængig variabel (f.eks. tid). Omfanget af evaluering begrundes på baggrund af den tiltænkte anvendelse af modellen.

▼B

B.37. **FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER EFTER AKUT EKSPONERING**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtest til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

*Organiske phosphorforbindelser* omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphosthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

*Forsinket neurotoksicitet* er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. REFERENCESTOFFER

Et referencestof kan testes med en positiv kontrolgruppe som middel til at påvise, at den undersøgte arts reaktion ikke har ændret sig signifikant under laboratorieforsøgsbetingelserne.

Et eksempel på et meget anvendt neurotoksisk stof er tri-o-tolylphosphat (CAS nr. 78-30-8, Einecs nr. 201-103-5, CAS-nomenklatur: phosphorsyre, tris(2-methylphenyl)ester), også kendt som tris-o-cresylphosphat.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet indgives oralt i en enkelt dosis til tamhøner, som om nødvendigt har været beskyttet mod akutte kolinerge effekter. Dyrene observeres i 21 dage for unormal adfærd, ataxi og paralyse. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase, på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter indgift. 21 dage efter eksponering aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

▼B

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Forberedelser**

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.5.2. **Forsøgsbetingelser**

1.5.2.1. *Forsøgsdyr*

Unge, kønsmodne læggehøner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønsene bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.5.2.2. *Antal og køn*

Ud over forsøgsgruppen anvendes både en vehikelkontrolgruppe og en positiv kontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høns kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 21 dage lange observationsperiode med henblik på patologisk undersøgelse.

Den positive kontrolgruppe kan undersøges samtidig eller kan være en nylig historisk kontrolgruppe. Gruppen indeholder mindst seks høner, der behandles med et kendt neurotoksisk stof med forsinket virkning, tre høner til biokemisk undersøgelse og tre høner til patologisk undersøgelse. Regelmæssig ajourføring af historiske data anbefales. Der tilvejebringes nye data om positiv kontrol, hvis det pågældende laboratorium har ændret væsentlige elementer (f.eks. stamme, foder, laboratoriemiljø) i forsøgets gennemførelse.

▼B

1.5.2.3. *Dosisniveauer*

Der gennemføres en forundersøgelse med et passende antal høner og dosisniveaugrupper med henblik på at fastsætte det dosisniveau, der skal anvendes i hovedundersøgelsen. En vis dødelighed er normalt nødvendig i denne forundersøgelse til fastsættelse af en passende dosis til hovedundersøgelsen. For at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter kan imidlertid atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske reaktioner, anvendes. En række forskellige testmetoder kan anvendes til at vurdere den højeste ikke dødelige dosis af teststofferne (se metode B.l.A). Historiske data fra undersøgelser af høner eller andre toksikologiske oplysninger kan også anvendes som støtte ved valg af dosis.

Dosisniveauet for teststoffet i hovedundersøgelsen bør være så højt som muligt under hensyntagen til resultaterne af forundersøgelsen og den øvre dosisgrænse på 2 000 mg/kg legemsvægt. Eventuel dødelighed må ikke forhindre, at et tilstrækkeligt antal dyr overlever med henblik på biokemisk undersøgelse (seks) og histologisk undersøgelse (seks) efter 21 dage. Atropin eller et andet beskyttende middel, der vides ikke at interferere med forsinkede neurotoksiske raktioner, anvendes for at forhindre dødsfald som følge af akutte kolinerge effekter.

1.5.2.4. *Grænsetest*

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 2 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksisk virkning på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.5.2.5. *Observationsperiode*

Observationsperioden varer 21 dage.

1.5.3. **Fremgangsmåde**

Efter indgift af et beskyttende middel til forhindring af dødsfald som følge af akut kolinerg effekt indgives teststoffet i en enkelt dosis.

1.5.3.1. Generelle observationer

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt flere gange i løbet af de første to dage og derefter mindst en gang dagligt i en periode på 21 dage eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt, Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages de høner, der er udvalgt til patologisk undersøgelse, af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

▼B

1.5.3.2. Legemsvægt

Alle hønerne vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.5.3.3. Biokemisk undersøgelse

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe og tre høner fra den positive kontrolgruppe (hvis denne guppe undersøges samtidig) aflives inden for få dage efter indgift, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre haner fra vehikelkontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe efter 24 timer og tre efter 48 timer, mens de tre høner fra den positive kontrolgruppe aflives efter 24 timer. Hvis observation af kliniske tegn på forgiftning (dette kan ofte vurderes ved observation af tidspunktet for indtræden af kolinerge symptomer) indicerer, at det toksiske stof udskiltes meget langsomt, kan det være bedre at udtage væv fra tre høner på hvert af to andre tidspunkter mellem 24 timer og 72 timer efter administration.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

1.5.3.4. Makroskopisk undersøgelse

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af udseende af hjerne og rygmarv.

1.5.3.5. Histopatologisk undersøgelse

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen), medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og af ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver.

2. **DATA**

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet. Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

▼B

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden af og korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. **RAPPORTERING**

*FORSØGSRAPPORT*

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøget begyndelse.

Forsøgsbetingelser

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— oplysninger om eventuelle beskyttelsesmidler og om indgift heraf.

Resultater:

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. gruppe, herunder dødelighed

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 418 fra OECD.

▼B

B.38. **FORSINKET NEUROTOKSICITET VED ORGANISKE PHOSPHORFORBINDELSER GENTAGEN DOSIS — 28 DAGE**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af stoffers toksiske virkninger er det vigtigt at undersøge visse stofgruppers mulighed for at fremkalde specifikke former for neurotoksicitet, som i givet fald ikke kan påvises i andre toksicitetsundersøgelser. Visse organiske phosphorforbindelser har vist sig at forårsage forsinket neurotoksicitet og bør undersøges med henblik herpå.

Der kan anvendes in vitro-screeningtest til identificering af stoffer, som kan forårsage forsinket polyneuropati; negative resultater af in vitro-undersøgelser kan imidlertid ikke bruges som dokumentation for, at teststoffet ikke er neurotoksisk.

Denne 28 dages test for forsinket neurotoksicitet giver oplysninger om mulige sundhedsrisici som følge af gentagen eksponering i et begrænset tidsrum. Testen giver oplysninger om dosis/respons og kan danne grundlag for en vurdering af et nul-effekt-niveau (NOAEL), som kan anvendes ved fastsættelse af sikkerhedskriterier for eksponering.

Se den generelle indledning til del B.

1.2. DEFINITIONER

*Organiske phosphorforbindelser* omfatter uladede estere, thioestere og anhydrider af organiske phosphorsyrer, phosphonsyrer og phosphoramidsyrer eller tilsvarende phosphorthiosyrer, phosphonthiosyrer og phosphorthioamidsyrer eller andre stoffer, der kan forårsage den forsinkede neurotoksicitet, der til tider forekommer for denne stofgruppe.

*Forsinket neurotoksicitet* er et syndrom, der er knyttet til langvarig, forsinket opståen af ataxi, distal axonopati i rygmarv og perifere nerver og inhibition og aldring af neurotoksisk esterase (NTE) i nervevæv.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Daglige doser af teststoffet indgives oralt til høner i 28 dage. Dyrene observeres mindst en gang dagligt for unormal adfærd, ataxi og paralyse indtil 14 dage efter sidste dosis. Der foretages biokemiske målinger, navnlig inhibition af neurotoksisk esterase (NTE), på tilfældigt udvalgte høner fra hver gruppe, normalt 24 og 48 timer efter sidste dosis. To uger efter sidste dosis aflives de resterende høner, og der foretages en histopatologisk undersøgelse af udvalgt nervevæv.

▼B

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelser**

Unge, sunde kønsmodne høner, der er fri for virussygdomme og medicinering, der kan interferere med undersøgelsen, og hvis gang er normal, fordeles randomiseret i forsøgs- og kontrolgrupper og tilvænnes laboratoriebetingelserne i mindst fem dage inden undersøgelsens påbegyndelse.

Der anvendes bure eller indelukker, der giver hønsene fri bevægelighed, og som tillader uhindret observation af dyrenes gang.

Teststoffet bør normalt indgives oralt med mavesonde, gelatinekapsler eller en tilsvarende metode. Væsker kan indgives ufortyndet eller opløst i et passende vehikel, som f.eks. majsolie; faste stoffer bør om muligt opløses, eftersom store doser faste stoffer i gelatinekapsler ikke altid absorberes effektivt. For ikke-vandige vehikler skal vehiklets toksiske egenskaber kendes eller i givet fald bestemmes inden forsøget.

1.4.2. **Forsøgsbetingelser**

1.4.2.1. *Forsøgsdyr*

Unge, kønsmodne høner (Gallus gallus domesticus) på otte til tolv måneder anbefales. Der anvendes racer og stammer af standardstørrelse, og hønerne bør normalt være opdrættet under betingelser, som tillader bevægelsesfrihed.

1.4.2.2. *Antal og køn*

Der anvendes generelt mindst tre forsøgsgrupper og en vehikelkontrolgruppe. Vehikelkontrolgruppen behandles på samme måde som forsøgsgruppen, med undtagelse af administration af teststoffet.

Der anvendes et tilstrækkeligt antal høner i hver gruppe, så mindst seks høner kan aflives med henblik på biokemisk bestemmelse (tre på hvert af de to valgte tidspunkter) og seks kan overleve den 14 dage lange observationsperiode efter eksponering med henblik på patologisk undersøgelse.

1.4.2.3. *Dosisniveauer*

Dosisniveauerne vælges under hensyntagen til resultaterne af en test for forsinket neurotoksicitet efter akut eksponering og eventuelle andre foreliggende data vedrørende teststoffets toksicitet eller kinetik. Det højeste dosisniveau vælges med henblik på at inducere toksiske virkninger, om muligt forsinket neurotoksicitet, men ikke død eller tydelig lidelse. Herefter vælges en række dosisniveauer i faldende størrelse til påvisning af dosisrelaterede reaktioner og fravær af erkendbare virkninger (NOAEL) ved det laveste dosisniveau.

▼B

1.4.2.4. *Grænsetest*

Hvis et forsøg udført efter de her beskrevne retningslinjer med et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg legemsvægt/dag ikke fremkalder observerbare toksiske virkninger, og hvis der ikke kan ventes toksiske virkninger på grundlag af data fra strukturelt beslægtede stoffer, kan en undersøgelse med anvendelse af en højere dosis betragtes som unødvendig. Grænsetesten er kun relevant, hvis human eksponering indicerer, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

1.4.2.5. *Observationsperiode*

Dyrene observeres mindst en gang dagligt i eksponeringsperioden og 14 dage efter, medmindre de skal obduceres.

1.4.3. **Fremgangsmåde**

Dyrene indgives teststoffet syv dage om ugen i en periode på 28 dage.

1.4.3.1. *Generelle observationer*

Observationsperioden starter umiddelbart efter eksponering. Alle hønerne observeres omhyggeligt mindst en gang daglig i de 28 dage og i 14 dage efter eksponering, eller indtil det fastlagte aflivningstidspunkt. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder tidspunktet for indtræden af unormal adfærd og dennes type, grad og varighed. Observationerne omfatter, men er ikke begrænset til, unormal adfærd. Ataxi måles efter en talskala med mindst fire niveauer, og paralyse registreres. Mindst to gange om ugen udtages hønerne af burene og underkastes en periode med tvungen motorisk aktivitet, som f.eks. stigeklatring, med henblik på at lette observationen af minimale toksiske virkninger. Døende dyr og dyr, der viser symptomer på stærk smerte eller lidelse, fjernes, så snart de iagttages, hvorefter de aflives på human måde og obduceres.

1.4.3.2. *Legemsvægt*

Alle hønsene vejes lige inden indgift af teststoffet og mindst én gang om ugen derefter.

1.4.3.3. *Biokemisk undersøgelse*

Seks vilkårligt udvalgte høner fra hver forsøgs- og vehikelkontrolgruppe aflives få dage efter indgift af sidste dosis, og hjernen og den lumbale rygmarv præpareres og undersøges for inhibition af neurotoksisk esterase, Derudover kan det være nyttigt at præparere og undersøge ischiasnervevæv for inhibition af neurotoksisk esterase. Normalt aflives tre høner fra kontrolgruppen og fra hver forsøgsgruppe 24 timer og tre 48 timer efter sidste dosis. Hvis data fra undersøgelsen for akut toksicitet eller andre undersøgelser (f.eks. toksikokinetik) indicerer, at andre tidspunkter for aflivning efter sidste dosis er bedre end de her nævnte, anvendes disse med angivelse af begrundelsen herfor.

Hvis det skønnes hensigtsmæssigt, kan der også foretages analyser af acetylcholinesterase (AChE) på disse prøver. Spontan reaktivering af AChE kan imidlertid indtræde in vivo og således føre til, at stoffets AChE-inhiberende aktivitet undervurderes.

▼B

1.4.3.4. *Makroskopisk undersøgelse*

Den makroskopiske undersøgelse af alle dyrene (aflivet efter forsøgets afslutning eller under forsøget, fordi de var døende) omfatter observation af hjerne og rygmarv.

1.4.3.5. *Histopatologisk undersøgelse*

Der foretages en mikroskopisk undersøgelse af nervevæv fra dyr, der overlever observationsperioden, og som ikke er anvendt til de biokemiske undersøgelser. Væv fikseres in situ ved anvendelse af perfusionsmetoder. Snittene bør omfatte cerebellum (længdesnit langs midterlinjen) medulla oblongata, rygmarv og de perifere nerver. Rygmarvssnit tages fra det øvre cervikale segment, midt i brysthulen og det lumbosakrale område. Der tages snit af det distale område af tibianerven og dens udløbere til musculus gastrocnemius og ischiasnerven. Snittene farves med passende myelin- og axonspecifikke farver. Først foretages der en mikroskopisk undersøgelse af præserveret væv fra alle dyrene i kontrolgruppen og højdosisgruppen. Hvis der er tegn på virkninger i højdosisgruppen, foretages der også en mikroskopisk undersøgelse af høner fra mellem- og lavdosisgrupperne.

2. **DATA**

Hvis resultaterne for de udvalgte endepunkter i denne metode (biokemi, histopatologi og adfærdsobservation) er negative, kræves der normalt ikke yderligere undersøgelse for forsinket neurotoksicitet Ved tvetydige eller inkonklusive resultater for disse endepunkter kan yderligere vurdering være nødvendig.

Der tilvejebringes individuelle data. Herudover opstilles alle data i tabelform, der for hver forsøgsgruppe viser antallet af dyr ved forsøgets start, antallet af dyr, der udviser læsioner, adfærdsmæssige eller biokemiske virkninger, typen og graden af disse læsioner eller virkninger og procentdelen af dyr, der udviser hver enkelt type eller grad af læsion eller virkning.

Resultaterne af denne undersøgelse vurderes med hensyn til incidensen og sværhedsgraden og af korrelationen mellem adfærdsmæssige, biokemiske og histopatologiske virkninger og eventuelle andre observerede virkninger i forsøgs- og kontrolgrupper.

Resultater i talform vurderes med passende og generelt accepterede statistiske metoder. De anvendte statistiske metoder udvælges i forbindelse med forsøgets udformning.

3. **RAPPORTERING**

*FORSØGSRAPPORT*

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme

— dyrenes antal og alder

— herkomst, laboratoriemiljø osv.

— hvert af dyrenes vægt ved forsøgets begyndelse.

▼B

Forsøgsbetingelser:

— oplysninger om teststoffets formulering, stabilitet og homogenitet, hvor dette er relevant

— begrundelse for valg af vehikel

— oplysninger om indgift af teststoffet

— oplysninger om foder- og vandkvalitet

— begrundelse for valg af dosis

— angivelse af indgivne doser, herunder oplysninger om vehiklet og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— begrundelse for valg af andre tidspunkter for biokemisk bestemmelse end efter 24 og 48 timer.

Resultater

— data for legemsvægt

— data for toksiske reaktioner pr. dosisniveau, herunder dødelighed

— nul-effekt-niveau (NOAEL)

— de kliniske observationers art, grad og varighed (reversible eller ej)

— en detaljeret beskrivelse af biokemiske metoder og fund

— obduktionsfund

— en detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— eventuel statistisk behandling af resultaterne.

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

Denne metode svarer til TG 419 fra OECD.

▼B

## B.39. TEST FOR UNSCHEDULED DNA-SYNTESE (UDS) MED PATTEDYRLEVERCELLER IN VIVO

### 1. METODE

Denne metode er en gengivelse af OECD Test Guideline 486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

### 1.1. INDLEDNING

Formalet med testen for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo er at påvise, om et teststof inducerer dna-reparation i levercellerne hos de behandlede dyr (1) (2) (3) (4).

Denne in vivo-test indeholder en metode til undersøgelse af kemikaliers gentoksiske virkninger i leveren. Det målte endpoint er tegn på dna-beskadigelse og deraf følgende reparation i leverceller. Leveren er normalt det sted, hvor absorberede stoffer først og fremmest metaboliseres. Den er derfor et egnet sted til in vivo-måling af dna-beskadigelse.

Hvis der er grund til at tro, at teststoffet ikke vil nå frem til målvævet, er denne test ikke egnet.

Endpoint for unscheduled DNA-syntese (UDS) måles ved at bestemme optagelsen af mærkede nukleosider i celler, hvor der ikke foregår planmæssig dna-syntese (S-fase). Den mest benyttede teknik består i at bestemme optagelsen af tritiummærket thymidin ($^3$H-TdR) ved autoradiografi. Der bør fortrinsvis benyttes rottelevere i UDS-test in vivo. Der kan benyttes andet væv end levervæv, men det er ikke omfattet af denne metode.

Påvisningen af et UDS-respons afhænger af, hvor mange dna-baser der er skåret ud og erstattet på det beskadigede sted. Derfor er UDS-testen særlig værdifuld til påvisning af stoffremkaldt »longpatch repair« (20-30 baser). Til gengæld er følsomheden over for »short-patch repair« (1-3 baser) meget lavere. Endvidere kan der optræde mutagene hændelser som følge af manglende reparation, forkert reparation eller forkert replikation af dna-skader. UDS-metodens reaktion er ikke noget mål for, i hvor høj grad reparationsprocessen er lykkedes. Ydermere er det muligt, at et mutagen reagerer med dna, men at dna-beskadigelsen ikke repareres ved en udskæringsreparationsproces. De beskedne specifikke oplysninger om mutagen aktivitet, som UDS-testen giver, opvejes af, at dens endpoint potentielt har høj følsomhed, eftersom det måles i hele genomet.

Se også den generelle indledning til del B.

### 1.2. DEFINITIONER

**Celler under reparation:** et NNG-tal, der er højere end en forud fastsat værdi, som det laboratorium, der udfører testen, skal begrunde.

**Nettokernekorn (NNG):** kvantitativt mål for cellers UDS-aktivitet ved en autoradiografisk UDS-test; tallet beregnes ved at trække gennemsnitsantallet af cytoplastmakorn i kerneækvivalente områder af cytoplasmaet (CG) fra antallet af kernekorn (NG), dvs. NNG = NG-CG. NNG-tallet beregnes for den enkelte celle, hvorefter tallene samles i puljer for celler i samme kultur, for parallelle kulturer osv.

▼B

**Unscheduled DNA-syntese (UDS):** dna-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en dna-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

UDS-testen med pattedyrleverceller in vivo viser dna-reparationssyntese efter udskæring og fjernelse af en dna-streng, der indeholder en region, der er beskadiget af kemiske stoffer eller fysiske påvirkninger. Testen baseres sædvanligvis på indsætning af $^{3}$H-TdR i dna'et i leverceller, hvor der er lav forekomst af celler i cellecyklussens S-fase. Optagelse af $^{3}$H-TdR bestemmes normalt ved autoradiografi, eftersom denne teknik, i modsætning til f.eks. væskescintillation, ikke er følsom over for interferens fra celler i S-fase.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Præparater**

1.4.1.1. *Valg af dyreart*

Der benyttes sædvanligvis rotter, selv om andre egnede pattedyrarter kan benyttes. Der bør anvendes almindeligt brugte laboratoriestammer af unge sunde voksne dyr. Ved undersøgelsens begyndelse bør vægtvariationen mellem dyrene være mindst mulig og ikke over ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

1.4.1.2. *Miljø og fodring*

Der gælder de almindelige forhold som beskrevet i den generelle indledning til del B, blot bør der tilstræbes en fugtighed på 50-60 %.

1.4.1.3. *Forberedelse af dyrene*

Der udvælges tilfældigt sunde unge voksne dyr til kontrol- og behandlingsgruppen. Burene bør anbringes på en sådan måde, at deres placering får mindst mulig indvirkning. Dyrene identificeres entydigt og holdes i deres bure i mindst fem dage, inden undersøgelsen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene.

1.4.1.4. *Teststof/testpræparat*

Teststoffer i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes passende, inden de gives til dyrene. Teststoffer i væskeform kan enten gives direkte til dyrene eller fortyndes først. Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

1.4.2. **Testbetingelser**

1.4.2.1. *Opløsningsmiddel/bærestof*

Opløsningsmiddel/bærestof må ikke have toksiske virkninger ved de benyttede doser og må ikke mistænkes for at reagere kemisk med teststoffet. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte, skal brugen af dem underbygges med kompatibilitetsdata. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolgrupper*

I hver individuelt gennemført del af forsøget medtages der sideløbende både positive og negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolgrupper. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgrupperne behandles på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

Positive kontrolstoffer bør være stoffer, der vides at fremkalde UDS, når de indgives i en dosis, der forventes at give en påviselig forøgelse i forhold til baggrundsværdierne. Positive kontrolstoffer, der kræver metabolismeaktivering, bør benyttes i doser, der frembringer moderat reaktion (4). Doserne kan vælges på en sådan måde, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem. Nedenfor er opregnet eksempler på positive kontrolstoffer:

| Prøveudtagningstidspunkt | Stof | CAS nr. | Einecs nr. |
|---|---|---|---|
| Tidlig prøveudtagning (2-4 timer) | N-nitrosodimethylamin | 62-75-9 | 200-249-8 |
| Sen prøveudtagning | N-2-fluorenylacetamid | 53-96-3 | 200-188-6 |

Der kan anvendes andre egnede positive kontrolstoffer. Det kan accepteres, at den positive kontrol indgives på anden måde end teststoffet.

1.5. FREMGANGSMÅDE

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Der anvendes tilstrækkelig mange dyr til, at der er taget hensyn til den naturlige variation i reaktionerne på testen. Der skal være mindst tre analyserbare dyr i hver gruppe. Er der indsamlet en betydelig historisk database, kræves der kun et eller to dyr i sideløbende negative og positive kontrolgrupper.

Hvis der på det tidspunkt, hvor undersøgelsen foretages, foreligger data fra undersøgelser med samme dyreart og med samme indgiftsmåde, som viser, at der ikke er nogen væsentlig toksicitetsforskel mellem de to køn, er test med kun et køn, helst hanner, tilstrækkeligt. Hvis udsættelsen af mennesker for det kemiske stof er kønsspecifik, som det f.eks. er tilfældet med visse farmaceutiske stoffer, skal testen udføres med dyr af det pågældende køn.

1.5.2. **Behandlingsplan**

Teststofferne indgives normalt i en enkelt behandling.

1.5.3. **Dosisniveauer**

Normalt benyttes der to dosisniveauer. Den højeste dosis defineres som den dosis, der fremkalder sådanne tegn på toksicitet, at højere dosis med samme indgiftsmønster må forventes at medføre død. Normalt bør laveste dosis være mellem 50 % og 25 % af den højeste dosis.

▼B

Stoffer med specifik biologisk aktivitet ved lav ikke-toksisk dosis (f.eks. hormoner og mitogener) kan danne undtagelser fra disse dosisfastsættelseskriterier og bør evalueres individuelt. Hvis der gennemføres en forprøve til bestemmelse af dosisinterval, fordi der ikke foreligger nogen egnede data, bør den udføres i samme laboratorium med samme art, stamme, køn og behandlingsmåde, som agtes benyttet i hovedundersøgelsen.

Højeste dosis kan også defineres som en dosis, der i nogen grad udviser tegn på toksicitet i leveren (f.eks. pyknotiske kerner).

1.5.4. **Grænsetest**

Hvis der ved en test med én dosis på mindst 2 000 mg pr. kg legemsvægt indgivet på én gang eller i to omgange samme dag ikke kan iagttages nogen toksiske virkninger, og hvis man på grundlag af data om strukturmæssigt beslægtede stoffer ikke forventer gentoksicitet, er en fuldstændig undersøgelse muligvis ikke nødvendig. Den forventede eksponering af mennesker kan foranledige, at der benyttes en højere dosis i grænsetesten.

1.5.5. **Indgift af doser**

Teststoffet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle. Andre indgiftsmåder kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da leveren derved kan udsættes for teststoffet direkte og ikke via kredsløbet. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml pr. 100 g legemsvægt. Anvendelse af større rumfang skal begrundes. Bortset fra lokalirriterende og ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

1.5.6. **Præparering af leverceller**

Leverceller fra behandlede dyr præpareres normalt 12-16 timer efter indgiften. Medmindre reaktionen på dette tidspunkt er tydeligt positiv, er desuden yderligere en tidlig prøveudtagning (normalt to-fire timer efter indgiften) sædvanligvis påkrævet. Andre tidspunkter for prøveudtagning kan benyttes, når de kan begrundes med toksikokinetiske data.

Korttidskulturer af pattedyrleverceller etableres sædvanligvis ved perfusion af leveren in situ med collagenase, idet man lader frisk dissocierede leverceller sætte sig fast på en egnet flade. Leverceller fra negative kontroldyr skal have en levedygtighed (5) på mindst 50 %.

1.5.7. **Bestemmelse af UDS**

Nyligt isolerede pattedyrleverceller inkuberes normalt i et medium, der indeholder $^{3}$H-TdR i et passende tidsrum, f.eks. tre-otte timer. Når inkubationstiden er afsluttet, fjernes mediet fra cellerne, som dernæst kan inkuberes i et medium, der indeholder overskud af umærket thymidin, så ikke-indbygget radioaktivitet (»cold chase«) bliver mindst mulig. Cellerne skylles, fikseres og tørres. Ved længere inkuberingstider er »cold chase« ikke altid nødvendigt. Objektglassene dyppes i autoradiografiemulsion, eksponeres i mørke (f.eks. i køleskab i 7-14 dage), fremkaldes og farves, og de eksponerede sølvkorn tælles. Der fremstilles to-tre objektglas pr. dyr.

▼B

1.5.8. **Analyse**

De præparede objektglas skal indeholde tilstrækkelig mange celler med normal morfologi til, at der kan foretages en meningsfyldt vurdering af UDS. Præparaterne undersøges mikroskopisk for tegn på åbenlys cytotoksicitet (f.eks. pyknose eller nedsat radioaktiv mærkning).

Objektglassene kodes, inden kornene tælles. Normalt bedømmes der 100 celler fra hvert dyr på mindst to objektglas; bedømmelse af mindre end 100 celler pr. dyr skal begrundes. Der tælles ikke korn for celler i S-fase, men andelen af celler i S-fase kan registreres.

Den mængde $^{3}$H-TdR, der indbygges i kerner og cytoplasma i morfologisk normale celler, og som giver sig udtryk i afsættelse af sølvkorn, bestemmes med egnede metoder.

Der foretages korntælling over kernerne (kernekorn, NG) og kerneækvivalente områder over cytoplasmaet (cytoplasmakorn, CG). CG-tallene fremkommer enten ved at tage de kraftigst mærkede cytoplasmaområder eller ved at tage gennemsnittet af to-tre tilfældigt foretagne tællinger af cytoplasmakorn i nærheden af kernerne. Der kan benyttes andre tællemetoder (f.eks. helcelletælling), hvis de kan begrundes (6).

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Dataene præsenteres for hvert enkelt objektglas og hvert enkelt dyr. Desuden sammenfattes alle data i tabel form. For hver celle, hvert dyr og hver dosis og tidspunkt beregnes tallet for nettokernekorn (NNG) ved at trække CG-tallene fra NG-tallene. Hvis der tælles »celler under reparation«, skal de kriterier, der benyttes til definering af »celler under reparation«, begrundes og underbygges med tidligere og sideløbende negative kontroldata. Talresultater kan evalueres ved statistiske metoder. Eventuelt benyttede statistiske test skal vælges og begrundes, inden undersøgelsen gennemføres.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Nedenfor følger nogle eksempler på kriterier for positiv/negativ reaktion:

| | | |
|---|---|---|
| positiv | (i) | NNG-værdier, der er højere end en forud fastsat tærskelsværdi, som er begrundet med udgangspunkt i laboratoriets tidligere data eller |
| | (ii) | NNG-værdier, der er signifikant større end sideløbende kontrol |
| negativ | (i) | NNG-værdier, der er inden for eller under en kontroltærskelværdi, der bygger på tidligere resultater eller |
| | (ii) | NNG-værdier, der ikke er signifikant større end sideløbende kontrol |

▼B

Dataenes biologiske relevans skal tages i betragtning, f.eks. sådanne parametre som variation mellem dyr, sammenhæng mellem dosis og respons og cytotoksicitet. Statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne. Statistisk signifikans bor ikke være den eneste faktor, der afgør, om resultatet bedømmes som positivt.

De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i sjældne tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

Et positivt resultat af en test for unscheduled DNA-syntese (UDS) med pattedyrleverceller in vivo viser, at teststoffet inducerer dna-skader i pattedyrleverceller in vivo, som kan repareres ved unscheduled DNA-syntese in vivo. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke inducerer dna-skader, der kan påvises ved denne test.

Sandsynligheden for, at teststoffet eller dets metabolitter når frem til målvævet (f.eks. systemisk toksicitet), bør diskuteres.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Opløsningsmiddel/bærestof:

— begrundelse for valg af bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof, hvis den kendes

Forsøgsdyr:

— anvendt art/stamme

— antal dyr og deres alder og køn

— oprindelse, miljø, føde mv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse, samt interval, gennemsnit og standardafvigelse for legemsvægten for hver enkelt gruppe

Testbetingelser:

— positive og negative (bærestof/opløsningsmiddel) kontrolgrupper

— data fra en eventuel forprøve til bestemmelse af dosisinterval

— begrundelse for valg af dosisniveau

— detaljerede oplysninger om præparering af teststoffet

— detaljerede oplysninger om indgift af teststoffet

— begrundelse for indgiftsvej

— eventuelle metoder til kontrol af, at teststoffet er nået frem til det almindelige kredsløb eller målvævet

▼B

— eventuel omregning fra teststofkoncentration (ppm) i føde/drikkevand til faktisk dosis (mg pr. kg legemsvægt pr, dag)

— detaljerede oplysninger om føde- og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— metoder til præparering og dyrkning af leverceller

— anvendt autoradiografiteknik

— antal præparerede objektglas og antal bedømte celler

— evalueringskriterier

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

Resultater:

— gennemsnitsværdier af kernekorn, cytoplasmakorn og nettokernekorn for hvert enkelt objektglas, dyr og gruppe

— dosis/respons-sammenhæng, når det er muligt

— eventuelle statistiske analyser

— tegn på toksicitet

— data for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit og standardafvigelser

— antal »celler under reparation«, hvis det er bestemt

— antal celler i S-fase, hvis det er bestemt

— cellernes levedygtighed

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, H., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In* Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 12-133.

(3) Kennelly, J.C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D.J. and Fox, M., (eds.), Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo,* Mutations Res., 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In*Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.L. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In* Vivo/ln Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553-562.

▼B

B.40. **IN VITRO-HUDÆTSNING: MÅLING AF TRANSKUTAN ELEKTRISK MODSTAND (TER)**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 430 (2004).

1.1. INDLEDNING

Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel vævsødelæggelse i huden efter påføring af teststof (jf. definitionen i Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures (GHS)) (1). Med denne metode opnås der en procedure, hvor ætsning kan vurderes uden brug af levende dyr.

Vurderingen af hudætsning har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (2). Betænkelighederne ved de smerter og lidelser, der er forbundet med denne fremgangsmåde, er omhandlet i revisionen af testmetode B.4, som muliggør bestemmelse af hudætsning ved hjælp af alternative in vitro-metoder, så dyrene undgår smerter og lidelser.

Første trin mod definitionen af alternative test, der kan anvendes til test af hudætsning, og som kan anvendes i lovgivningsøjemed, var gennemførelsen af prævalideringsundersøgelser (3). Herefter blev der gennemført (6)(7)(8) en formel valideringsundersøgelse af in vitro-metoder til vurdering af hudætsning (4)(5). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser og anden offentliggjort litteratur henstilles det, at følgende test anvendes til vurdering af in vivo-hudætsning (9)-(10)(11): test med human hudmodel (se testmetode B.40.A) og test til måling af transkutan elektrisk modstand (denne metode).

I henhold til valideringsundersøgelserne og andre offentliggjorte undersøgelser kan målingen af transkutan elektrisk modstand (TER) i rottehud (12)(13) på pålidelig vis skelne mellem stoffer, der er hudætsende, og stoffer, der ikke er hudætsende.

Den test, der er beskrevet i denne metode, muliggør identifikation af ætsende kemiske stoffer og blandinger. Den muliggør endvidere identifikation af stoffer og blandinger, der ikke er hudætsende, med støtte af væsentlig dokumentation om bestemmelse ved hjælp af andre eksisterende oplysninger (f.eks. pH, forholdet mellem struktur og aktivitet samt human- og/eller dyredata) (1)(2)(11)(14). Den giver ikke tilstrækkelige oplysninger om hudirritation og muliggør heller ikke underinddeling af ætsende stoffer som tilladt i henhold til GHS-systemet (Globally Harmonised Classification System) (1).

For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering anbefales det at følge den sekventielle teststrategi, der fremgår af testmetode B.4 (2) og GHS-systemet (Globally Harmonised System) (1). Denne teststrategi omfatter gennemførelse af in vitro-test for hudætsning (som beskrevet i forbindelse med denne metode) og hudirritation, inden test i levende dyr overvejes.

▼B

1.2. DEFINITION

**In vivo-hudætsning:** er fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, nemlig synlig nekrose gennem epidermis til dermis, efter applikation af et teststof i op til fire timer. Typiske eksempler på ætsende reaktioner er ulcera, blødning, blodige sår og ved slutningen af observationsperioden på 14 dage misfarvning som følge af afblegning af huden, hele områder af alopecia og ar. Histopatologisk undersøgelse bør overvejes for at evaluere tvivlsomme læsioner.

**Transkutan elektrisk modstand (TER):** er et mål for hudens elektriske impedans som en modstand i kiloohm. En simpel og robust metode til vurdering af barrierefunktion, hvor passagen af ioner gennem hud registreres ved hjælp af en Wheatstone-målebro.

1.3. REFERENCESTOFFER

*Tabel 1*

**Referencestoffer**

| Navn | EINECS nr. | CAS nr. | |
|---|---|---|---|
| 1,2-diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | Stærkt ætsende |
| acrylsyre | 201-177-9 | 79-10-7 | Stærkt ætsende |
| 2-tert-butylphenol | 201-807-2 | 88-18-6 | Ætsende |
| kaliumhydroxid (10 %) | 215-181-3 | 1310-58-3 | Ætsende |
| svovlsyre (10 %) | 231-639-5 | 7664-93-9 | Ætsende |
| octansyre (kaprylsyre) | 204-677-5 | 124-07-02 | Ætsende |
| 4-amino-1,2,4-triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | Ikke ætsende |
| eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | Ikke ætsende |
| phenethylbromid | 203-130-8 | 103-63-9 | Ikke ætsende |
| tetrachlorethylen | 204-825-9 | 27-18-4 | Ikke ætsende |
| isostearinsyre | 250-178-0 | 30399-84-9 | Ikke ætsende |
| 4-(methylthio)-benzaldehyd | 222-365-7 | 3446-89-7 | Ikke ætsende |

De fleste af de anførte kemiske stoffer er hentet fra listen over kemiske stoffer, der var udvalgt til den internationale ECVAM-valideringsundersøgelse (4). De er udvalgt ud fra følgende kriterier:

i) der skal være et lige stort antal ætsende og ikke-ætsende stoffer

▼B

ii) der skal medtages stoffer, som findes i handelen, og som dækker de fleste af de relevante kemiske grupper

iii) der skal indgå stærkt ætsende og mindre ætsende stoffer for at muliggøre skelnen mellem ætsningsstyrke

iv) de udvalgte kemiske stoffer skal kunne håndteres på et laboratorium, uden at der opstår andre alvorlige risici end risikoen for ætsning.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Testmaterialet påføres i op til 24 timer på den epidermale overflade af hudlapper i et testsystem med to rum, hvor hudlapperne fungerer som adskillelse mellem de to rum. Hudlapperne tages fra 28-30 dage gamle rotter, der er aflivet på en human måde. Ætsende stoffer identificeres ved deres evne til at beskadige stratum corneum og svække dets barrierefunktion, hvilket kan måles som en reduktion i den naturlige TER under en tærskelværdi (12). For rottehud-TER er der valgt en tærskelværdi på 5 kΩ på baggrund af omfattende data om en lang række kemiske stoffer, hvor langt de fleste værdier var enten klart langt over (ofte > 10 kΩ) eller langt under (ofte < 3 kΩ) denne værdi (12). Stoffer, som ikke er ætsende hos dyr, men som er irriterende eller ikke-irriterende, medfører generelt ikke en TER under denne tærskelværdi. Brugen af andre hudpræparater eller andet apparatur kan endvidere ændre tærskelværdien og nødvendiggøre yderligere validering.

Testproceduren omfatter et farvebindingstrin til bekræftende test af positive resultater i TER, herunder værdier omkring 5 kΩ. Farvebindingstrinnet viser, om stigningen i gennemtrængeligheden for ioner skyldes fysisk ødelæggelse af stratum corneum. TER-metoden med rottehud har vist sig at kunne forudsige in vivo-ætsningen hos kaniner vurderet i henhold til testmetode B.4 (2). Det bør bemærkes, at in vivo-kanintesten er særdeles konservativ med hensyn til hudætsning og hudirritation sammenlignet med lappeprøven med human hud (15).

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Dyr**

Rotter er valgt, fordi deres huds følsomhed over for kemiske stoffer i denne test tidligere er påvist (10). Rottens alder (når hudprøven tages) og stamme er særligt vigtig for at sikre, at hårfolliklerne er i hvile, inden væksten af voksenhår begynder.

▼B

Hårene på ryggen og flanken af unge (ca. 22 dage gamle) han- eller hunrotter af (Wistar-stammen eller lignende stamme) fjernes omhyggeligt med en lille dyresaks. Dyrene vaskes dernæst omhyggeligt, idet der gnubbes, og det pågældende hudområde holdes neddyppet i en opløsning af antibiotika, som f.eks. indeholder streptomycin, penicillin, chloramphenicol og amphotericin i koncentrationer, der er høje nok til at hæmme bakterievækst. Dyrene vaskes igen med antibiotika på tredje- og fjerdedagen efter den første vask og skal anvendes inden tre dage efter den anden vask, når stratum corneum har regenereret sig efter fjernelsen af hår.

1.5.2. **Fremstilling af hudlapper**

Dyrene aflives på human måde, når de er 28-30 dage gamle. Alderen er kritisk. Ryghuden fjernes fra hvert dyr, og overflødigt fedtvæv fjernes omhyggeligt, idet det skrælles af huden. Hudlapper med en diameter på ca. 20 mm udtages. Huden kan gemmes, inden lapperne anvendes, hvis det er påvist, at positive og negative kontroldata svarer til de data, der opnås med frisk hud.

Hver hudlap anbringes for enden af et rør af PTFE (polytetrafluorethylen), idet det sikres, at den epidermale overflade er i kontakt med røret. En O-ring af gummi sættes tætsluttende omkring rørets ende for at holde huden på plads, og overflødigt væv klippes af. Rørets og O-ringens dimensioner fremgår af figur 2. O-ringen af gummi forsegles derefter omhyggeligt til enden af PTFE-røret med vaseline. Røret fastholdes ved hjælp af fjederklemmer i et ydre kammer, som indeholder en $MgSO_4$-opløsning (154 mM) (figur 1). Hudlappen skal være fuldstændigt dækket af $MgSO_4$-opløsningen. Der kan fremstilles op til 10-15 hudlapper af huden fra en enkelt rotte.

Inden testen begynder, måles den elektriske modstand i to hudlapper for at kontrollere den enkelte dyrehuds kvalitet. For begge hudlapper skal modstanden være større end 10 kΩ, hvis resten af lapperne skal anvendes i testen. Hvis modstanden er mindre end 10 kΩ, kasseres resten af lapperne fra den pågældende hud.

1.5.3. **Påføring af test- og kontrolstoffer**

Samtidige positive og negative kontrolværdier skal anvendes i hver undersøgelse for at sikre, at forsøgsmodellen fungerer korrekt. Der skal anvendes hudlapper fra et enkelt dyr. Som positive og negative kontrolstoffer foreslås henholdsvis 10 M saltsyre og destilleret vand.

Flydende teststoffer (150 µl) påføres på den epidermale overflade inde i røret. Ved faste teststoffer skal tilstrækkeligt af stoffet påføres hudlappen, så hele overfladen er dækket af stoffet. Der tilsættes deioniseret vand (150 µl) oven på stoffet, og røret rystes forsigtigt. For at sikre maksimal kontakt med huden kan det være nødvendigt at opvarme visse faste stoffer til 30 °C, så de smelter eller blødgøres, eller formale dem til granulat eller pulver.

▼B

Der bruges tre hudlapper til hvert test- og kontrolstof. Teststofferne skal sidde på huden i 24 timer ved 20-23 °C. Teststoffet fjernes under rindende ledningsvand med en temperatur på højst 30 °C, indtil der ikke kan fjernes mere af stoffet.

1.5.4. **TER-målinger**

Hudens impedans måles, idet TER måles ved hjælp af en Wheatstone-lavvoltvekselstrømsmålebro (13). De generelle specifikationer for broen er en driftsspænding på 1-3 volt, en sinusformet eller rektangulært formet vekselstrøm på 50-1 000 Hz og et måleområde på mindst 0,1-30 kΩ. Den målebro, der anvendes i valideringsundersøgelsen, måler induktans, kapacitet og modstand op til værdier på henholdsvis 2 000 H, 2 000 μF og 2 MΩ ved frekvenser på 100 Hz eller 1 kHz ved hjælp af serier eller parallelle værdier. I forbindelse med TER-ætsningstesten registreres målingerne af modstand ved en frekvens på 100 Hz og ved hjælp af serieværdier. Før den elektriske modstand måles, reduceres hudens overfladespænding ved tilsætning af 70 % ethanol i så tilstrækkelig mængde, at hele hudens overflade dækkes. Efter nogle få sekunder fjernes ethanolen, og vævet fugtes ved tilsætning af 3 ml $MgSO_4$-opløsning (154 mM). Elektroderne fra målebroen anbringes på hver sin side af hudlappen for at måle modstanden i kΩ/hudlap (figur 1). Elektrodedimensioner og længden af elektroderne under krokodillenæbbene ses i figur 2. Krokodillenæbbet på den indre elektrode hviler på toppen af PTFE-røret under modstandsmålingen, hvorved man sikrer sig, at et konstant stykke af elektroden er nede i $MgSO_4$-opløsningen. Den ydre elektrode er anbragt inde i det ydre kammer, så den rører ved kammerbunden. Afstanden mellem fjederklemmen og bunden af PTFE-røret skal holdes konstant (figur 2), da den har indflydelse på den målte modstand. Det betyder, at afstanden mellem den indre elektrode og hudlappen skal være konstant og så lille som mulig (1-2 mm).

Hvis den målte modstand er større end 20 kΩ, kan dette skyldes, at rester af teststoffet ligger som en belægning på hudlappens overflade. Man kan forsøge at fjerne denne belægning ved at holde en tommelfinger iført en gummitut for PTFE-røret og ryste røret i ca. 10 sekunder. Derefter kasseres $MgSO_4$-opløsningen, og målingen gentages med en ny $MgSO_4$-opløsning.

Testapparaturets og forsøgsprocedurens egenskaber og dimensioner kan have indflydelse på de opnåede TER-værdier. Tærskelværdien for ætsning, 5 kΩ, blev bestemt med det apparatur og den fremgangsmåde, der er beskrevet i denne metode. Hvis testbetingelserne ændres, kan der blive tale om andre tærskel- og kontrolværdier. Det anbefales derfor, at metoden og tærskelværdien for modstand kalibreres ved at teste en række referencestandarder, der vælges blandt de kemikalier, som blev anvendt i valideringsundersøgelsen (4) (5), eller blandt de kemiske grupper, der svarer til de undersøgte kemiske stoffer. Tabel 1 viser et sæt relevante referencestoffer.

▼B

1.5.5. **Farvebindingsmetoder**

Eksponering for visse ikke-ætsende stoffer kan bevirke, at modstanden falder til under tærskelværdien på 5 kΩ, hvorved ioner kan passere gennem stratum corneum, hvilket sænker den elektriske modstand (5). Neutrale organiske stoffer og kemikalier med overfladeaktive egenskaber (herunder rengøringsmidler, emulgatorer og andre overfladeaktive stoffer) kan fjerne hudfedt og gøre barrieren gennemtrængelig for ioner. Hvis TER-værdierne for teststofferne er mindre end eller omkring 5 kΩ, og der ikke forekommer synlige ødelæggelser, skal farvestoffets evne til at trænge ned i kontrolvævet og det behandlede væv vurderes med henblik på at afgøre, om de opnåede TER-værdier skyldes øget hudgennemtrængelighed eller hudætsning (3)(5). I sidstnævnte tilfælde, hvor stratum corneum er ødelagt, trænger farvestoffet sulforhodamin B efter påføring på hudoverfladen hurtigt ned og farver det underliggende væv. Netop dette farvestof er stabilt i forbindelse med en lang række kemiske stoffer og påvirkes ikke af den ekstraktionsprocedure, der er beskrevet i det følgende.

1.5.5.1. *Påføring og fjernelse af farvestoffet sulforhodamin B*

Efter TER-undersøgelsen fjernes magnesiumsulfatopløsningen fra røret, og huden undersøges omhyggeligt for synlige ødelæggelser. Hvis der ikke forekommer synlig større ødelæggelse, påføres 150 µl af en 10 % (w/v)-opløsning af sulforhodamin B (Acid Red 52; C.I. 45100, EINECS nr. 222-529-8, CAS nr. 3520-42-1) i destilleret vand på den epidermale overflade af hver hudlap i 2 timer. Disse hudlapper vaskes derefter under vandhanen i ca. 10 sekunder med vand, der ikke er varmere end stuetemperatur, for at fjerne overskydende/ikke-bundet farvestof. Hver hudlap fjernes omhyggeligt fra PTFE-røret og anbringes i et glas (f.eks. et 20 ml-glas til scintillationsmålinger) indeholdende deioniseret vand (8 ml). Glasset rystes forsigtigt i 5 minutter for at fjerne yderligere ikke-bundet farvestof. Denne skylning gentages, hvorefter hudlapperne fjernes og anbringes i glas, der indeholder 5 ml af en 30 % (w/v)-opløsning af natriumdodecylsulfat (SDS) i destilleret vand. Glassene inkuberes ved 60 °C til næste dag.

Efter inkubationen fjernes og kasseres hudlapperne, og den tilbageværende opløsning centrifugeres i 8 minutter ved 21 °C (relativ centrifugalkraft ~ 175 × g). 1 ml af supernatanten fortyndes 5 gange (v/v) (dvs. 1 ml + 4 ml) med en 30 % (w/v) SDS-opløsning i destilleret vand. Opløsningens ekstinktion/optical density (OD) måles ved 565 nm.

1.5.5.2. *Beregning af farveindhold*

Mængden af sulforhodamin B pr. hudlap beregnes ud fra OD-værdierne (5) (sulforhodamin B's molære ekstinktionskoefficient ved 565 nm = 8,7 × $10^4$; molekylvægten = 580). Farveindholdet bestemmes for hver hudlap ved hjælp af en speciel kalibreringskurve, hvorefter et gennemsnitligt farveindhold beregnes for flergangsbestemmelser.

2. **DATA**

De målte resultater for modstand (kΩ) og eventuelt gennemsnitligt farveindhold (µg/hudlap) i teststoffet og i positive og negative kontroller skal fremlægges i tabelform, herunder også data fra flergangsbestemmelser/gentagne undersøgelser, gennemsnitsværdier og individuelle værdier.

▼B

2.1. FORTOLKNING AF RESULTATER

De gennemsnitlige TER-resultater godkendes, hvis de samtidige positive og negative kontrolværdier falder inden for de acceptable intervaller for metoden i testlaboratoriet. De acceptable modstandsintervaller for den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i følgende tabel:

| Kontrol | Stof | Modstandsinterval (kΩ) |
|---|---|---|
| Positiv | 10M saltsyre | 0,5 - 1,0 |
| Negativ | Destilleret vand | 10 - 25 |

De gennemsnitlige resultater for farvebinding godkendes, hvis de samtidige positive og negative kontrolværdier falder inden for de acceptable intervaller for metoden. De foreslåede acceptable intervaller for farveindhold for de kontrolstoffer, den metode og det apparatur, der er beskrevet ovenfor, er anført i følgende tabel:

| Kontrol | Stof | Interval af farveindhold (μg/hudlap) |
|---|---|---|
| Positiv | 10M saltsyre | 40-100 |
| Negativ | Destilleret vand | 15-35 |

Teststoffet betragtes ikke som værende hudætsende:

i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi for teststoffet er større end 5 kΩ, eller

ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi er mindre end eller lig med 5 kΩ, og

— hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse, og

— det gennemsnitlige farveindhold ligger langt under det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10M HCl.

Teststoffet betragtes som værende hudætsende:

i) hvis den gennemsnitlige TER-værdi er mindre end eller lig med 5 kΩ, og hudlappen er synligt beskadiget, eller

ii) hvis den gennemsnitlige TER-værdi er mindre end eller lig med 5 kΩ, og

— hudlappen ikke udviser synlig ødelæggelse, men

— det gennemsnitlige farveindhold er større end eller lig med det gennemsnitlige farveindhold, der samtidig er målt i den positive kontrol på 10M HC1.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— kemiske navne, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn og -nummer, hvis de kendes

— stoffets eller præparatets renhed og sammensætning (i procentdele efter vægt) og dets fysiske form

— fysiske-kemiske egenskaber, f.eks. fysisk tilstand, pH, stabilitet og opløselighed i vand, som er relevante for undersøgelsen

— eventuel behandling af test-/kontrolstoffet inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— eventuelt kendt stabilitet.

Forsøgsdyr:

— anvendt stamme og køn

— alder på dyr anvendt som donordyr

— kilde, opbevaring, kost osv.

— oplysninger om fremstillingen af hudlapper.

Testbetingelser:

— kalibreringskurver for testapparatur

— kalibreringskurver for gennemførelse af farvebindingstest

— detaljer om den anvendte testprocedure til TER-målinger

— detaljer om den anvendte testprocedure til eventuel måling af farvebinding

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— beskrivelse af de anvendte evalueringskriterier.

Resultater:

— angivelse i tabelform af data fra TER-måling og eventuel farvebindingsmåling for hvert enkelt dyr og hver enkelt hudlap

— beskrivelse af andre observerede virkninger.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Testmetode B.4. Akut toksicitet: hudirritation/ætsning.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483- 524.

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

(9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/episbrd.pdf.

(11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27* March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an inter-laboratory trial. Toxic. in Vitro 6, 191-194.

(14) Worth A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

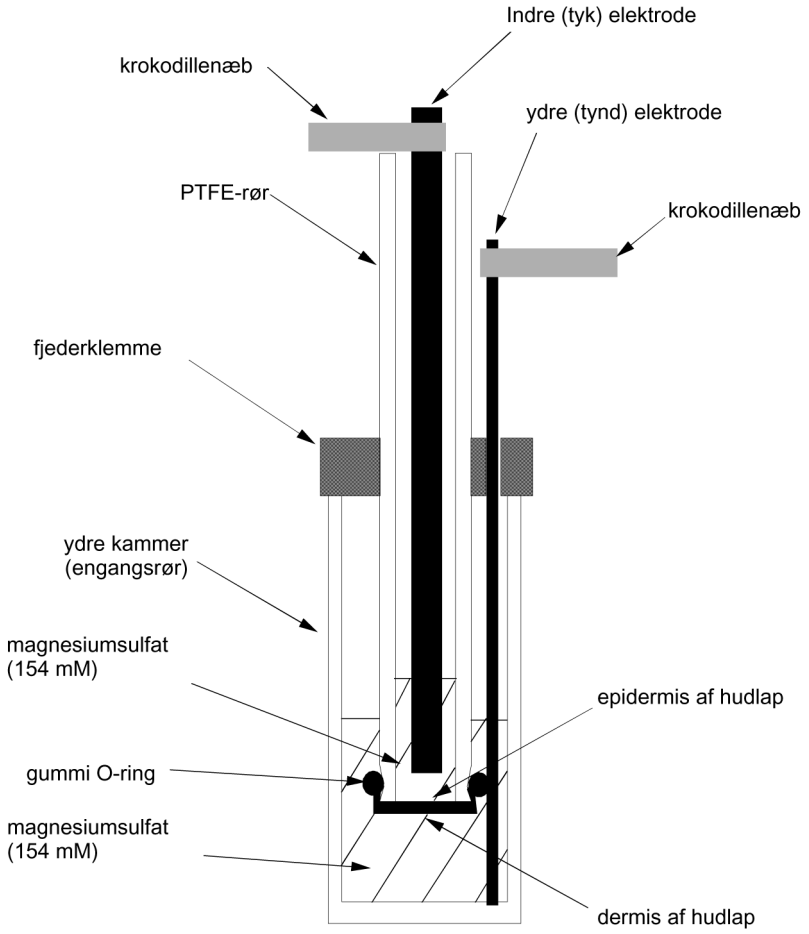
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845-852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7-17.

▼B

*Figur 1*

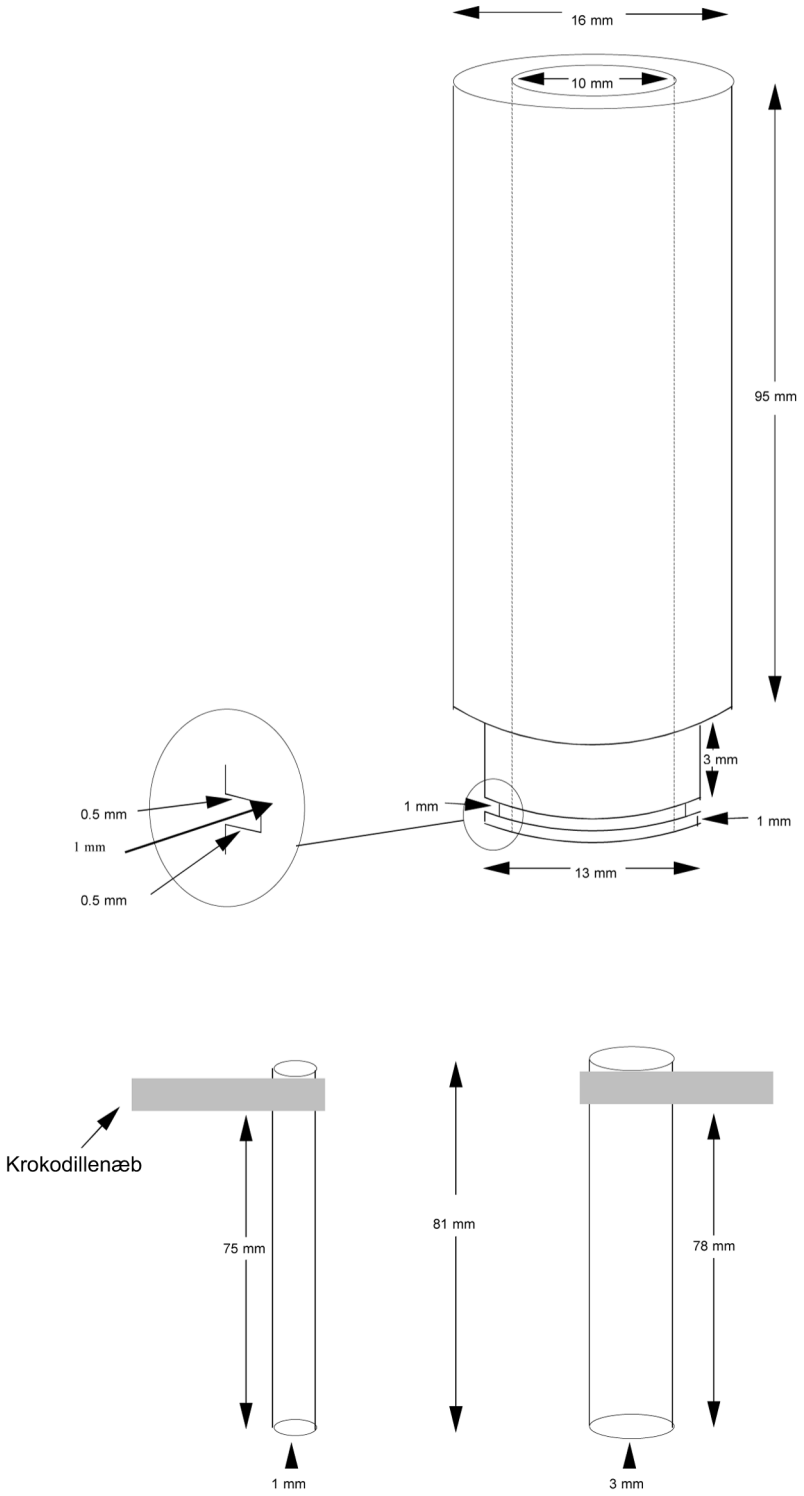
**Apparatur til TER-test med rottehud**



▼B

*Figur 2*

**Dimensioner på anvendte PFTE-rør, ydre rør og elektroder**



▼B

**Kritiske faktorer for det ovenfor viste apparatur:**

— PTFE-rørets indvendige diameter

— længden af elektroderne i forhold til PTFE-røret og det ydre rør, så hudlappen ikke berøres af elektroderne, og så en standard-længde af elektroden er i kontakt med $MgSO_4$-opløsningen

— mængden af $MgSO_4$-opløsning i det ydre rør bør sikre en væske-dybde i forhold til niveauet i PFTE-røret som vist i figur 1

— hudlappen bør være tilstrækkeligt fastgjort til PFTE-røret, så den elektriske måling er et sandt mål for hudens egenskaber.

▼B

B.40.A. **IN VITRO-HUDÆTSNING: TEST MED HUMAN HUDMODEL**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 431 (2004).

1.1. INDLEDNING

Hudætsning defineres som fremkomsten af irreversibel vævsødelæggelse i huden efter påføring af teststof (jf. definitionen i Globally Harmonised System for the Classification and Labelling of Chemical Substances and Mixtures (GHS)) (1). Denne testmetode kræver ikke brug af levende dyr eller dyrevæv til vurdering af hudætsning.

Vurderingen af hudætsning har typisk omfattet brug af laboratoriedyr (2). Betænkelighederne ved de smerter og lidelser, der er forbundet med denne fremgangsmåde, er omhandlet i revisionen af testmetode B.4, som muliggør bestemmelse af hudætsning ved hjælp af alternative in vitro-metoder, så dyrene undgår smerter og lidelser.

Første trin mod definitionen af alternative test, der kan anvendes til test af hudætsning, og som kan anvendes i lovgivningsøjemed, var gennemførelsen af prævalideringsundersøgelser (3). Herefter blev der gennemført (6)(7)(8) en formel valideringsundersøgelse af in vitro-metoder til vurdering af hudætsning (4)(5). På baggrund af resultatet af disse undersøgelser og anden offentliggjort litteratur (9) henstilles det, at følgende test anvendes til vurdering af in vivo-hudætsning (10)(11)12)(13): test med human hudmodel (denne metode) og test til måling af transkutan elektrisk modstand (se testmetode B.40).

I henhold til valideringsundersøgelserne kan test baseret på humane hudmodeller (3)(4)(5)(9) på pålidelig vis skelne mellem stoffer, der er hudætsende, og stoffer, der ikke er hudætsende. Med forsøgsprotokollen var det endvidere muligt at skelne mellem stærkt hudætsende og mindre stærkt hudætsende stoffer.

Den test, der er beskrevet i denne metode, muliggør identifikation af ætsende kemiske stoffer og blandinger. Den muliggør endvidere identifikation af stoffer og blandinger, der ikke er hudætsende, med støtte af væsentlig dokumentation om bestemmelse ved hjælp af andre eksisterende oplysninger (f.eks. pH, forholdet mellem struktur og aktivitet samt human- og/eller dyredata) (1)(2)(13)(14). Den giver normalt ikke tilstrækkelige oplysninger om hudirritation og muliggør heller ikke underinddeling af ætsende stoffer som tilladt i henhold til GHS-systemet (Globally Harmonised Classification System) (1).

For fuldt ud at kunne vurdere de lokale virkninger på huden efter en enkelt dermal eksponering anbefales det at følge den sekventielle teststrategi, der fremgår af testmetode B.4 (2) og GHS-systemet (Globally Harmonised System) (1). Denne teststrategi omfatter gennemførelse af in vitro-test for hudætsning (som beskrevet i forbindelse med denne metode) og hudirritation, inden test i levende dyr overvejes.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**In vivo-hudætsning:** er fremkomsten af irreversibel ødelæggelse af huden, nemlig synlig nekrose gennem epidermis til dermis, efter applikation af et teststof i op til fire timer. Typiske eksempler på ætsende reaktioner er ulcera, blødning, blodige sår og ved slutningen af observationsperioden på 14 dage misfarvning som følge af afblegning af huden, hele områder af alopecia og ar. Histopatologisk undersøgelse bør overvejes for at evaluere tvivlsomme læsioner.

**Cellernes levedygtighed:** er en parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation (f.eks. evnen hos cellulær mitokondrial dehydrogenase til at reducere det livsvigtige farvestof MTT), og som, afhængigt af det valgte endpoint og testens udformning, korrelerer med det totale antal celler og/eller deres levedygtighed.

1.3. REFERENCESTOFFER

*Tabel 1*

**Referencestoffer**

| Navn | EINECS nr. | CAS nr. | |
|---|---|---|---|
| 1,2-diaminopropan | 201-155-9 | 78-90-0 | Stærkt ætsende |
| acrylsyre | 201-177-9 | 79-10-7 | Stærkt ætsende |
| 2-tert-butylphenol | 201-807-2 | 88-18-6 | Ætsende |
| kaliumhydroxid (10 %) | 215-181-3 | 1310-58-3 | Ætsende |
| svovlsyre (10 %) | 231-639-5 | 7664-93-9 | Ætsende |
| octansyre (kaprylsyre) | 204-677-5 | 124-07-02 | Ætsende |
| 4-amino-1,2,4-triazol | 209-533-5 | 584-13-4 | Ikke ætsende |
| eugenol | 202-589-1 | 97-53-0 | Ikke ætsende |
| phenethylbromid | 203-130-8 | 103-63-9 | Ikke ætsende |
| tetrachlorethylen | 204-825-9 | 27-18-4 | Ikke ætsende |
| isostearinsyre | 250-178-0 | 30399-84-9 | Ikke ætsende |
| 4-(methylthio)-benzaldehyd | 222-365-7 | 3446-89-7 | Ikke ætsende |

De fleste af de anførte kemiske stoffer er hentet fra listen over kemiske stoffer, der var udvalgt til den internationale ECVAM-valideringsundersøgelse (4). De er udvalgt ud fra følgende kriterier:

i) der skal være et lige stort antal ætsende og ikke-ætsende stoffer

ii) der skal medtages stoffer, som findes i handelen, og som dækker de fleste af de relevante kemiske grupper

iii) der skal indgå stærkt ætsende og mindre ætsende stoffer for at muliggøre skelnen mellem ætsningsstyrke

▼B

iv) de udvalgte kemiske stoffer skal kunne håndteres på et laboratorium, uden at der opstår andre alvorlige risici end risikoen for ætsning.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet påføres på en tredimensional human hudmodel, som mindst omfatter en rekonstrueret epidermis med et fungerende stratum corneum. Ætsende stoffer identificeres ved deres evne til at bringe cellers levedygtighed (f.eks. påvist med MTT-reduktionstesten (15)) ned under en fastlagt tærskelværdi efter en bestemt eksponeringstid. Testmetoden med forsøgsopstilling med human hud er baseret på den hypotese, at kemikalier er ætsende, når de er i stand til at trænge gennem stratum corneum ved diffusion eller erosion og er cytotoksiske for de underliggende cellelag.

1.4.1. **Procedure**

1.4.1.1. *Humane hudmodeller*

Humane hudmodeller kan konstrueres eller købes i handelen (f.eks. EpiDerm™-og EPISKIN™-modellerne) (16)(17)(18)(19), eller de kan udvikles eller konstrueres i testlaboratoriet (20)(21). Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser. En ny model bør valideres (som minimum i det omfang, der er beskrevet i 1.4.1.1.2). Humane hudmodeller, der anvendes i forbindelse med denne test, skal overholde følgende:

1.4.1.1.1. Almindelige modelbetingelser

Humane keratinocytter skal anvendes til at konstruere epithel. Der skal være flere lag af levedygtige epithelceller til stede under et fungerende stratum corneum. Hudmodellen kan også have lag med en stromal komponent. Stratum corneum skal være flerlaget og have den nødvendige fedtprofil til at udgøre en effektiv barriere, der kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske markører. Modellens fysiske udformning skal forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv. Passage af kemiske teststoffer uden om stratum corneum vil forringe modelleringen af hudens eksponering. Hudmodellen skal være fri for kontamination med bakterier (herunder mykoplasma) og svampe.

1.4.1.1.2. Funktionsmæssige modelbetingelser

Graden af levedygtighed kvantificeres normalt ved hjælp MTT eller andre livsvigtige farvestoffer, der omdannes metabolisk. I disse tilfælde skal absorbansen (optical density (OD)) i det ekstraherede (opløste) farvestof fra den negative kontrol være mindst 20 gange større end absorbansen i ekstraktionsmidlet alene (se oversigten i (22)). Vævet i den negative kontrol skal have stabil kultur (levere enslydende levedygtighedsmålinger) i hele testeksponeringsperioden. Stratum corneum skal være tilstrækkeligt robust til at modstå hurtig gennemtrængning af visse cytotoksiske kemiske markørstoffer (f.eks. 1 % Triton X-100). Denne egenskab kan bedømmes ud fra den eksponeringstid, der er nødvendig for at reducere cellelevedygtigheden med 50 % ($ET_{50}$) (for the EpiDerm™- og EPISKIN™-modellen er det f.eks. > 2 timer). Vævet skal give reproducerbarhed over længere tid og helst mellem laboratorier. Det skal endvidere kunne forudsige referencestoffernes ætsningsstyrke (se tabel 1), når det anvendes i forbindelse med den valgte forsøgsprotokol.

▼B

1.4.1.2. *Påføring af test- og kontrolstoffer*

Der anvendes to vævsprøver til hver behandling (eksponeringstid), inkl. kontroller. Ved flydende stoffer skal der påføres tilstrækkeligt teststof til, at hudoverfladen dækkes (mindst 25 µl/cm$^2$). Ved faste stoffer skal der påføres tilstrækkeligt stof til, at huden dækkes med et jævnt lag. Stofferne skal fugtes med deioniseret eller destilleret vand for at sikre god hudkontakt. Om nødvendigt skal de males til et pulver, før de påføres. Påføringsmetoden skal være velegnet til det pågældende teststof (se f.eks. henvisning (5)). Efter eksponeringsperioden skal teststoffet omhyggeligt vaskes af hudoverfladen med en buffer eller 0,9 % NaCl.

Samtidige positive og negative kontrolværdier skal anvendes i hver undersøgelse for at sikre, at forsøgsmodellen fungerer korrekt. Som positivt kontrolstof foreslås iseddikesyre eller 8N KOH. Som negativt kontrolstof foreslås 0,9 % NaCl eller vand.

1.4.1.3. *Måling af cellelevedygtighed*

Enhver kvantitativ, godkendt metode kan anvendes til at måle cellernes levedygtighed. Målingen af levedygtighed skal endvidere kunne anvendes sammen med en tredimensional hudmodel. Ikkespecifik farvebinding må ikke interferere med levedygtighedsmålingen. Proteinbindende farvestoffer og farvestoffer, som ikke undergår metabolisk omdannelse (f.eks. Neutral Red), kan derfor ikke anvendes. Den hyppigst anvendte måling er MTT-reduktionstesten [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Thiazolyl Blue: EINECS nr. 206-069-5, CAS nr. 298-93-1], som har vist sig at give nøjagtige og reproducerbare resultater (5), men andre kan anvendes. Hudlappen lægges i en MTT-opløsning af passende koncentration (f.eks. 0,3-1 mg/ml) ved en passende inkubationstemperatur i tre timer. Det udfældede blå formazan ekstraheres ved hjælp af et opløsningsmiddel (isopropanol), og formazankoncentrationen beregnes ud fra måling af absorbans ved en bølgelængde mellem 540 og 595 nm.

Teststoffets kemiske reaktion med det livsvigtige farvestof kan efterligne den metaboliske reaktion i cellerne, hvilket resulterer i en falsk levedygtighedsmåling. Dette har vist sig at ske, når et sådant teststof ikke fjernes fuldstændigt fra huden ved skylning (9). Hvis teststoffet reagerer direkte med det levedygtige farvestof, skal der anvendes yderligere kontroller til at spore og korrigere for teststoffernes interferens med levedygtighedsmålingen (9)(23).

2. **DATA**

For hver hudlap skal der for teststof og for positive og negative kontroller fremlægges absorbansværdier og beregnede tal for procentuel cellelevedygtighed i tabelform, herunder data fra flergangsbestemmelser/gentagne bestemmelser, gennemsnitsværdier og enkeltværdier.

▼B

2.1. FORTOLKNING AF RESULTATER

De absorbansværdier, som måles ved hver undersøgelse, anvendes til beregning af den procentuelle levedygtighed i forhold til en negativ kontrol, som vilkårligt sættes til 100 %. Den procentuelle tærskelværdi af cellelevedygtighed, som adskiller ætsende fra ikke-ætsende stoffer (eller som skelner mellem forskellige grader af ætseevne), skal klart defineres, dokumenteres og påvises at være hensigtsmæssig. Generelt bliver disse tærskelværdier fastlagt under testoptimeringen, afprøvet i prævalideringsfasen og bekræftet ved en valideringsundersøgelse. Følgende benyttes f.eks. ved forudsigelse af ætsningsevne i forbindelse med EpiDerm™ -modellen (9):

Teststoffet betragtes som værende hudætsende:

i) hvis levedygtigheden efter tre minutters eksponering er mindre end 50 %, eller

ii) hvis levedygtigheden efter tre minutters eksponering er større end eller lig med 50 %, og levedygtigheden efter en times eksponering er mindre end 15 %.

Teststoffet betragtes ikke som værende hudætsende:

i) hvis levedygtigheden efter tre minutters eksponering er større end eller lig med 50 %, og levedygtigheden efter en times eksponering er større end eller lig med 15 %.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstof:

— kemiske navne, f.eks. IUPAC- eller CAS-navn og -nummer, hvis de kendes

— stoffets eller præparatets renhed og sammensætning (i procentdele efter vægt)

— fysiske-kemiske egenskaber, f.eks. fysisk tilstand, pH, stabilitet og opløselighed i vand, som er relevante for undersøgelsen

— eventuel behandling af test-/kontrolstoffet inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— eventuelt kendt stabilitet.

Begrundelse for valg af hudmodel og forsøgsprotokol.

Testbetingelser:

— anvendt cellesystem

— kalibreringsinformationer for udstyr anvendt til måling af cellelevedygtighed (f.eks. spektrofotometer)

▼B

— komplet dokumentation for den anvendte hudmodel, herunder godkendelsen heraf

— detaljer om den anvendte testprocedure

— anvendte testdoser

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— reference til historiske data for modellen

— beskrivelse af de anvendte evalueringskriterier.

Resultater:

— angivelse i tabelform af data fra hver enkelt testprøve

— beskrivelse af andre observerede virkninger.

Diskussion af resultater.

Konklusion

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

(2) Testmetode B.4. Akut toksicitet: hudirritation/ætsning.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219-255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, L, Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471-482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team Toxic *In Vitro* 12, 483-524.

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129-147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

▼B

(9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp. 371-401.

(10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365-67.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

(13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709-720.

(15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55-63.

(16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889-891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211-225.

(18) Tinois E., Gaetani Q., Gayraud B., Dupont D., Rougier A., Pouradier D.X. (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133-140.

(19) Tinois E., Tiollier J., Gaucherand M., Dumas H., Tardy M., Thivolet J. (1991). In vitro and post -transplantation differentiation of humankeratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayereddermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310-319.

(20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H.(1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163-171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747-756.

▼B

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69-84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. In VItro 15, 57-93.

▼B

B.41. **IN VITRO 3T3 NRU-FOTOTOKSICITETSTEST**

1. **METODE**

Denne metode er ækvivalent med OECD TG 432 (2004).

1.1. INDLEDNING

Fototoksicitet defineres som det toksiske respons på et stof, der påføres kroppen, og som enten er blevet fremkaldt af eller forstærket af (kan konstateres ved lavere doser) eksponering for lys, eller som er forårsaget af bestråling af huden efter systemisk indgift af et stof.

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten anvendes til at afdække det fototoksiske potentiale i et testmateriale, når det exciteres ved lyspåvirkning. Testen evaluerer fotocytotoksicitet ud fra den relative reduktion i levedygtigheden af de celler, der udsættes for det kemiske stof under lyspåvirkning, sammenlignet med samme situation uden lys. De stoffer, som identificeres ved denne test, er sandsynligvis fototoksiske in vivo efter systemisk påføring og fordeling på huden eller efter lokal påføring.

Der er rapporteret om mange typer kemiske stoffer, der fremkalder fototoksiske virkninger (1)(2)(3)(4). Et fælles træk er deres evne til at absorbere lysenergi inden for sollysets spektrum. Ifølge fotokemiens grundlov (Grotthaus-Draper-loven) forudsætter fotoreaktion en tilstrækkelig optaget lysmængde. Derfor skal man, inden man overvejer en biologisk testning, bestemme testkemikaliets absorptionsspektrum for UV/synligt lys i henhold til OECD Test Guideline 101. Det er påstået, at det kemiske stof sandsynligvis ikke er fotoreaktivt, hvis den molære ekstinktions- og absorptionskoefficient er mindre end 10 liter × $mol^{-1}$ × $cm^{-1}$. Et kemisk stof af denne type behøver ikke nødvendigvis at blive testet i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten eller i nogen anden biologisk test for skadelige fotokemiske virkninger (1)(5). Se også bilag 1.

Pålideligheden og relevansen af in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er blevet evalueret for nylig (6)(7)(8)(9). In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten har vist sig at kunne forudsige akutte fototoksicitetsvirkninger på dyr og mennesker in vivo. Testen er ikke beregnet til at forudsige andre skadelige virkninger, der måtte opstå fra samtidig påvirkning fra et kemisk stof og lys. Eksempelvis påviser den ikke fotogenotoksicitet, fotoallergi eller fotocarcinogenicitet, og den er heller ikke beregnet til vurdering af fototoksisk styrke. Testen er endvidere ikke beregnet til at påvise indirekte mekanismer ved fototoksicitet, virkninger af stofskifteprodukter på testmaterialet eller virkninger af blandinger.

Hvor anvendelsen af metaboliserende systemer er et generelt krav til alle in vitro-testninger til forudsigelse af genotoksisk og carcinogent potentiale, er der indtil nu i forbindelse med fototoksikologi kun få tilfælde, hvor der kræves metabolisk transformation for at få det kemiske stof til at reagere som fototoksin in vivo eller in vitro. Det anses derfor hverken som nødvendigt eller videnskabeligt begrundet at gennemføre nærværende testning med et metabolisk aktiverings system.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Strålingsintensitet:** intensiteten af ultraviolet (UV) eller synligt lys, der falder på en overflade. Intensiteten måles i $W/m^2$ eller $mW/cm^2$.

**Lysdosis:** mængden (= intensitet × tid) af ultraviolet (UV) eller synligt lys, der falder på en overflade, udtrykt i joule (= W × s) pr. overfladeareal, f.eks. $J/m^2$ eller $J/cm^2$.

**UV-lys, bølgelængdeområder:** følgende betegnelser er anbefalet af CIE (Den Internationale Belysningskommission): UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) og UVC (100-280 nm). Der anvendes også andre betegnelser. Grænsen mellem UVB og UVA sættes ofte ved 320 nm, og UVA kan inddeles i UV-A1 og UV-A2, hvor grænsen ligger ved ca. 340 nm.

**Cellernes levedygtighed:** parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation (f.eks. optagelse af det livsvigtige farvestof Neutral Red i cellelysosomer), hvilket, afhængigt af det målte endepunkt og det anvendte testdesign, korrelerer med det samlede celleantal og/eller cellevitaliteten.

**Relativ cellelevedygtighed:** cellelevedygtighed udtrykt i forhold til negative kontroller (opløsningsmiddel), der har været gennem hele testforløbet (enten +Irr eller –Irr), og som ikke er behandlet med kemiske teststoffer.

**PIF (fotoirritationsfaktor):** faktor, der beregnes ved sammenligning mellem to lige effektive cytotoksiske koncentrationer ($IC_{50}$) af det kemiske teststof ved fravær af (–Irr) og ved tilstedeværelse af (+Irr) i en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

$IC_{50}$: koncentrationen af det kemiske teststof, der reducerer cellelevedygtigheden med 50 %.

**MPE (gennemsnitlig lyseffekt):** måling, der er afledt af en matematisk analyse af de koncentrationsresponskurver, der fremkommer ved fravær af (–Irr) og ved tilstedeværelse af (+Irr) i en ikke-cytotoksisk bestråling med UVA/synligt lys.

**Fototoksicitet:** akut toksisk respons, der fremkommer efter den første eksponering af huden for visse kemiske stoffer og efterfølgende eksponering for lys, eller som er fremkaldt på samme måde ved hudbestråling efter systemisk indgift af et kemisk stof.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

In vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten er baseret på en sammenligning mellem cytotoksiciteten af et kemisk stof, når det afprøves med og uden eksponering for en ikke-cytotoksisk dosis af simuleret sollys. Cytotoksicitet er i denne testning udtrykt som en koncentrationsafhængig reduktion af optagelsen af det livsvigtige farvestof Neutral Red som målt 24 timer efter behandling med det kemiske teststof og bestråling (10). NR er et svagt kationisk farvestof, der let gennemtrænger cellemembraner ved ikke-diffusion og akkumuleres intracellulært i lysosomer. Forandringer i overfladen i den sensitive lysosommembran fører til lysosomal ustabilitet og andre forandringer, der gradvist bliver uoprettelige. Den type forandringer, der forårsages af miljøfremmede stoffer, medfører et fald i optagelsen og bindingen af NR. Det er således muligt at skelne mellem levedygtige, beskadigede og døde celler, hvilket er grundlaget for denne test.

▼B

Balb/c 3T3-celler dyrkes i 24 timer, så der dannes encellede lag. To 96-huls plader for hvert kemisk teststof præinkuberes med otte forskellige koncentrationer af teststoffet i 1 time. Derefter eksponeres den ene af de to plader for den højeste ikke-cytotoksiske strålingsdose, mens den anden plade holdes i mørke. På begge plader erstattes behandlingsmediet derefter af kulturmedium, og efter endnu 24 timers inkubation bestemmes cellelevedygtigheden ved Neutral Red-optagelsen. Cellelevedygtigheden udtrykkes som en procentdel i forhold til ubehandlede kontrolkulturer med opløsningsmiddel og beregnes for hver testkoncentration. For at forudsige det fototoksiske potentiale sammenholdes koncentrationerne for samme respons med og uden stråling, sædvanligvis på $IC_{50}$-niveau, dvs. den koncentration, der reducerer cellelevedygtigheden til 50 % sammenlignet med de ubehandlede kontroller.

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Forberedelser**

1.4.1.1. *Celler*

I valideringsundersøgelserne blev der anvendt en permanent musefibroblast cellelinje, Balb/c 3T3, klon 31, enten fra American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA, eller fra European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, Det Forenede Kongerige, og det anbefales derfor at anskaffe materiale fra en velanskrevet cellebank. Hvis der blot kan påvises ækvivalens, kan der anvendes andre celler eller cellelinjer til samme testprocedure, hvis kulturforholdene er tilpasset cellernes specifikke behov.

Celler bør regelmæssigt undersøges for, at de ikke indeholder mycoplasmasmitte, og de bør kun anvendes, hvis de er absolut smittefrie (11).

Det er vigtigt, at cellernes UV-følsomhed undersøges regelmæssigt i henhold til den procedure for kvalitetskontrol, som er beskrevet i denne metode. Eftersom cellers UVA-følsomhed kan stige med antallet af cellegenerationer, bør der anvendes Balb/c 3T3 celler med lavest muligt antal, helst mindre end 100 (se punkt 1.4.2.2.2 og bilag 2).

1.4.1.2. *Medier og dyrkningsbetingelser*

Der bør anvendes korrekte dyrkningsmedie- og inkubationsforhold til rutinemæssige celledyrkninger under testproceduren. For Balb/c 3T3-celler er de korrekte forhold f.eks. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suppleret med 10 % serum fra nyfødte kalve, 4 mM glutamin, penicillin (100 IU), streptomycin (100 g/ml) og inkubation i fugtig atmosfære ved 37 ºC, 5-7,5 % $CO_2$, afhængigt af buffer (se punkt 1.4.1.4, andet afsnit). Der er især vigtigt, at dyrkningsforholdene for cellekulturen tillader en cellecyklustid inden for cellernes eller cellelinjernes normale historiske område.

1.4.1.3. *Forberedelse af kulturerne*

Celler fra nedfrosne kulturer podes i kulturmedier ved passende tæthed og dyrkes i subkultur mindst en gang, inden de anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

▼B

Celler, der anvendes til fototoksicitetstesten, podes i et kulturmedium med passende tæthed, så kulturerne ikke løber sammen ved testens afslutning, dvs. cellelevedygtigheden bestemmes 48 timer efter podning af cellerne. For Balb/c 3T3-celler, der dyrkes på 96-huls plader, er den anbefalede podningstæthed for cellerne $1 \times 10^4$ celler pr. hul.

For hver test podes kemikalieceller ensartet i to separate 96-huls plader, der begge sideløbende gennemfører hele testproceduren under identiske kulturforhold med undtagelse af den tid, hvor den ene af pladerne bestråles (+Irr), og den anden holdes i mørke (–Irr).

1.4.1.4. *Forberedelse af teststof*

Teststoffer skal være friske og forberedes umiddelbart inden brug, medmindre data påviser, at de er stabile ved opbevaring. Det anbefales, at enhver form for kemisk håndtering og den indledende behandling af cellerne udføres under lysforhold, der udelukker fotoaktivering eller nedbrydning af teststoffet inden bestråling.

Testkemikalierne skal være opløst i buffer-saltopløsninger, f.eks. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), eller andre fysiologiske buffer-opløsninger, der skal være fri for proteinkomponenter og lysabsorberende komponenter (f.eks. pH-indikatorfarver og vitaminer) for at undgå interferens under bestråling. Da celler under bestråling holdes uden for $CO_2$-inkubatoren i ca. 50 minutter, skal man være særligt påpasselig for at undgå alkalisering. Hvis der anvendes svage buffere som f.eks. EBSS, kan alkalisering undgås ved at inkubere cellerne ved 7,5 % $CO_2$. Hvis cellerne inkuberes ved kun 5 % $CO_2$, skal der vælges en stærkere buffer.

Testkemikalier med begrænset opløselighed i vand skal opløses i et passende opløsningsmiddel. Hvis der anvendes opløsningsmiddel, skal det forefindes i et konstant volumen i alle kulturer, dvs. i de negative (opløsningsmiddel)kontroller og i alle koncentrationer af testkemikaliet, og det skal være ikke-cytotoksisk ved den pågældende koncentration. Der skal vælges en sådan koncentration af testkemikaliet, at man undgår udfældning og uklare opløsninger.

Dimethylsulfoxid (DMSO) og ethanol (EtOH) er de anbefalede opløsningsmidler. Andre opløsningsmidler med lav cytotoksicitet kan også være velegnede. Inden brug skal alle opløsningsmidler vurderes for specifikke egenskaber f.eks. reaktion med testkemikaliet, quenching af den fototoksiske effekt, evne til at opfange radikaler og/eller kemisk stabilitet i opløsningen.

Vortexblanding og/eller ultralydbehandling og/eller opvarmning til passende temperaturer kan anvendes for at fremme opløsningen, medmindre dette kan påvirke testkemikaliets stabilitet.

▼B

1.4.1.5. *Betingelser for bestråling*

1.4.1.5.1. Lyskilde

Valg af den rette lyskilde og filtre er en afgørende faktor i fototoksicitetstestning. Lys i UVA-området og det synlige område forbindes almindeligvis med fototoksiske reaktioner in vivo (3)(12), hvorimod UVB ofte er mindre relevant, men kraftigt cytotoksisk. Cytotoksiciteten stiger 1 000 gange, når bølgelængden går fra 313 til 280 nm (13). Kriterierne for valg af passende lyskilde skal bl.a. omfatte krav om, at lyskilden udsender bølgelængder, der absorberes af testkemikaliet (absorptionsspektrum), og at lysmængden (der kan opnås inden for en acceptabel eksponeringstid) skal være tilstrækkelig til bestemmelse af kendte fotocytotoksiske kemiske stoffer. Endvidere skal bølgelængder og de anvendte doser ikke påføre testsystemet unødige skader, f.eks. som følge af varmestråling (det infrarøde område).

Simulering af sollys med solsimulatorer anses for at være den optimale kunstlyskilde. Fordelingen af bestråling s styrken i den filtrerede solsimulator skal ligge tæt på fordelingen i udendørs dagslys, som det fremgår af (14). Både xenonlysbuer og (doterede) kviksølvmetalhalogenidlysbuer anvendes som solsimulatorer (15). Sidstnævnte har den fordel, at de udsender mindre varme og er billigere, men ligheden med sollys er knap så perfekt som xenonlysbuernes. Eftersom alle solsimulatorer udsender væsentlige mængder UVB, skal de være behørigt filtrerede for at dæmpe de stærkt cytotoksiske UVB-bølgelængder. Da plastmaterialer til cellekulturer indeholder UV-stabilisatorer, skal spektret måles gennem den samme type 96-huls pladelåg, som anvendes ved testningen. Uanset hvilke forholdsregler der er taget for at dæmpe dele af spektret ved filtrering eller som følge af uundgåelige filtereffekter fra udstyret, må det spektrum, der måles på under disse filtre, ikke afvige fra standard udendørs dagslys (14). Et eksempel på den spektrale strålingsintensitetsfordeling i den filtrerede solsimulator, der anvendes i valideringsundersøgelsen i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, fremgår af (8)(16). Se også bilag 2, figur 1.

1.4.1.5.2. Dosimetri

Lysintensiteten kontrolleres regelmæssigt før hver fototoksicitetstest ved hjælp af et bredbåndet UV-meter. Intensiteten måles gennem den samme type 96-huls pladelåg, som anvendes ved testen. UV-meteret skal være kalibreret til kilden. UV-meterets ydelse kontrolleres, og til dette formål anbefales det at anvende et ekstra UV-meter af samme type og med samme kalibrering som reference. Det optimale ville være, med lidt længere mellemrum, at anvende et spektroradiometer til måling af den spektrale intensitet af den filtrerede lyskilde og til kontrol af kalibreringen af det bredbåndede UV-meter.

En dosis på 5 J/cm$^2$ (målt i UVA-området) er blevet bestemt til at være ikke-cytotoksisk for Balb/c 3T3-celler og tilstrækkelig kraftig til at få kemiske stoffer til at udløse fototoksiske reaktioner (6) (17). For at nå op på 5 J/cm$^2$ inden for en periode på 50 min blev intensiteten f.eks. justeret til 1,7 mW/cm$^2$. Se bilag 2, figur 2. Hvis der anvendes en anden cellelinje eller en anden lyskilde, skal strålingsdosen eventuelt kalibreres, så der vælges en dosering, der ikke er skadelig for cellerne, men samtidig tilstrækkelig til at udløse standardfototoksiner. Lyseksponeringens varighed beregnes på følgende måde:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{bestrålinsgdosis } (J/\ cm^2) \times 1000}{\text{strålingsitensitet } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1J = 1\ \text{Wsek})$$

1.4.2. **Forsøgsbetingelser**

1.4.2.1. *Teststoffets koncentrationer*

Koncentrationsområdet for et kemisk stof, der testes henholdsvis med (+Irr) og uden (–Irr) lys, skal nøje fastlægges ud fra eksperimenter til bestemmelse af dosisområde. Det kan være nyttigt at vurdere opløseligheden fra starten og ved 60 min (eller ved den behandlingstid, der skal anvendes), idet opløseligheden kan ændre sig efterhånden eller i løbet af eksponeringstiden. For at undgå toksicitet fremkaldt af forkerte kulturforhold eller af stærkt sure eller alkaliske kemikalier skal pH-værdien i cellekulturer, der er tilsat testkemikalier, ligge i området 6,5 - 7,8.

Den højeste koncentration af teststoffet skal ligge inden for fysiologiske testforhold. F.eks. skal belastende osmotiske og pH-mæssige forhold undgås. Afhængigt af teststof kan det være nødvendigt at overveje andre fysisk-kemiske egenskaber som faktorer til fastlæggelse af den højeste testkoncentration. Med hensyn til relativt opløselige stoffer, der ikke er toksiske ved koncentrationer op til mætningspunktet, skal den højest mulige koncentration testes. Generelt skal man undgå udfældning af teststoffet ved enhver testkoncentration. Den maksimale koncentration af et teststof bør ikke overstige 1 000 μg/ml. Osmolalitet bør ikke overstige 10 mM. Der skal anvendes en geometrisk fortyndingsrække bestående af otte teststofkoncentrationer med en konstant fortyndingsfaktor (se punkt 2.1, andet afsnit).

Hvis der findes oplysninger (fra et eksperiment til områdebestemmelse) om, at testkemikaliet ikke er cytotoksisk op til grænsekoncentrationen i mørkeeksperimentet (–Irr), men at det er stærkt cytotoksisk, når det bestråles (+Irr), kan man for at overholde kvalitetskravene til relevante data vøege andre koncentrationsområder for (+Irr)-eksperimentet end dem, der er valgt for (–Irr)-eksperimentet.

1.4.2.2. *Kontrolkulturer*

1.4.2.2.1. Cellernes strålingsfølsomhed, etablering af historiske data

Celler skal kontrolleres regelmæssigt (ca. ved hver femte cellegeneration) for følsomhed over for lyskilden ved at vurdere deres levedygtighed efter at være eksponeret for stigende doser af bestråling. Til denne vurdering skal der anvendes adskillige bestrålingsdoser og også niveauer, der er væsentligt højere end de værdier, der anvendes ved 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Disse doser kvantificeres lettest ved at måle UV-dele af lyskilden. Celler podes med den tæthed, der er anvendt i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, og bestråles den følgende dag. Cellelevedygtigheden bestemmes en dag senere ud fra Neutral Red-optagelsen. Det skal påvises, at den heraf følgende højeste ikke-cytotoksiske dosis (f.eks. i valideringsundersøgelsen: 5 J/cm$^2$ [UVA]) var tilstrækkelig til at klassificere referencekemikalierne (tabel 1) korrekt.

▼B

1.4.2.2.2. Strålingsfølsomhed, kontrol af den aktuelle test

Testen overholder kvalitetskriterierne, hvis de bestrålede negative/opløsningsmiddelholdige kontrolkulturer udviser en levedygtighed på mere end 80 % sammenlignet med ikke-bestrålede negative/opløsningsmiddelholdige kontroller.

1.4.2.2.3. Levedygtigheden for kontrolkulturer med opløsningsmiddel

Den absolutte absorbans (optical density) ($OD_{540\ NRU}$) for Neutral Red ekstraheret fra kontrolkulturer med opløsningsmiddel indikerer, om de $1 \times 10^4$ celler, der er podet pr. hul, har vokset med normal fordoblingstid i løbet af testens to dage. En testning opfylder de accepterede kriterier, hvis middelværdien af $OD_{540\ NRU}$ for de ubehandlede kontrolkulturer er $\geq$ 0,4 (dvs. ca. 20 gange baggrundsopløsningsmidlets absorbans).

1.4.2.2.4. Positiv kontrol

Et velkendt fototoksisk kemisk stof skal undersøges sideløbende med hver in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstest. Klorpromazin (CPZ) kan anbefales hertil. For CPZ, der testes ifølge standardprotokollen for in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten, er der defineret følgende godkendelseskriterier for afprøvningen: bestrålet CPZ (+Irr): $IC_{50}$ = 0,1 til 2,0 g/ml, ikke-bestrålet CPZ (–Irr): $IC_{50}$ = 7,0 til 90,0 g/ml. Fotoirritationsfaktoren (PIF) skal være > 6. Den positive kontrols historiske ydelse skal overvåges.

Andre fototoksiske kemikalier, der er velegnede i forhold til den kemiske klasse eller opløselighedskarakteristikken af det kemiske stof, der skal evalueres, kan anvendes som sideløbende positiv kontrol i stedet for klorpromazin.

1.4.3. **Testprocedure (6)(7)(8)(16)(17)**

1.4.3.1. *Første dag*

Der anbringes 100 µl kulturmedium i de ydre huller i en 96-huls mikrotiterplade til vævskultur (= negative kontroller). I de øvrige huller tilsættes 100 µl af en cellesuspension med $1 \times 10^5$ celler/ml i kulturmedium (= $1 \times 10^4$ celler/hul). Der skal klargøres to plader for hver serie af individuelle teststofkoncentrationer samt til opløsningsmiddelkontrollen og den positive kontrol.

Cellerne inkuberes i 24 timer (se punkt 1.4.1.2), indtil de danner et halvt sammenflydende encellet lag. Denne inkubationsperiode tillader cellegendannelse, adhæsion og eksponentiel vækst.

1.4.3.2. *Anden dag*

Efter inkubation dekanteres kulturmediet fra cellerne, som vaskes omhyggeligt med 150 µl af det bufferopløsningsmiddel, der blev anvendt til inkubationen. Der tilsættes 100 µl af bufferen med den korrekte koncentration af teststoffet eller opløsningsmidlet (kontrolkultur med opløsningsmiddel). Der benyttes otte forskellige koncentrationer af teststoffet. Cellerne med teststoffet inkuberes i mørke i 60 minutter (se punkt 1.4.1.2 og punkt 1.4.1.4, andet afsnit).

Blandt de to plader, der er klargjort til hver serie koncentrationer af teststof og kontrolmateriale, udvælges der en tilfældig plade til bestemmelse af cytotoksicitet (–Irr), dvs. kontrolpladen, og desuden en behandlingsplade til bestemmelse af fotocytotoksicitet (+Irr).

▼B

+Irr-eksponeringen gennemføres ved at bestråle cellerne ved stuetemperatur i 50 minutter gennem låget på 96-huls pladen med den størst mulige strålingsdosis, der ikke er cytotoksisk (se også bilag 2). Ikke-bestrålede plader (–Irr) opbevares ved stuetemperatur i en mørk kasse i 50 minutter (= lyseksponeringstiden).

Testopløsningen dekanteres fra, og der vaskes to gange omhyggeligt med 150 µl af den bufferopløsning, der anvendes til inkubation, men som ikke indeholder teststoffet. Bufferen erstattes med kulturmediet, og der inkuberes til næste dag (18-22 timer). Se punkt 1.4.1.2.

1.4.3.3. *Tredjedag:*

1.4.3.3.1 Mikroskopisk evaluering

Med et fasekontrast-mikroskop undersøges cellerne med hensyn til vækst, morfologi og enkeltlagets integritet. Ændringer i cellemorfologi og påvirkninger af cellevækst registreres.

1.4.3.3.2. Test af optagelsen af Neutral Red

Cellerne vaskes med 150 µl forvarmet buffer. Vaskeopløsningen fjernes ved at banke let på pladen. Der tilsættes 100 µl af en 50 µg/ml Neutral Red (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazinhydrochlorid, EINECS nr. 209-035-8; CAS nr. 553-24-2; C.I. 50040) til dyrkningsmediet uden serum (16), og der inkuberes som beskrevet i punkt 1.4.1.2 i tre timer. Efter inkubation fjernes Neutral Red-mediet, og cellerne vaskes med 150 µl buffer. Efter dekantering fjernes overskydende buffer med sugende papir eller ved centrifugering.

Der tilsættes nøjagtig 150 µl Neutral Red-desorptionsopløsning (frisk fremstillet af 49 dele vand + 50 dele ethanol + 1 del eddikesyre).

Mikrotiterpladen rystes forsigtigt på en mikrotiterpladeshaker i 10 minutter, indtil al Neutral Red er ekstraheret fra cellerne, og der er dannet en homogen opløsning.

OD af Neutral Red-ekstraktet måles ved 540 nm i et spektrofotometer med blindprøver som reference. Resultaterne gemmes i et passende filformat med henblik på senere analyse.

## 2. DATA

### 2.1. DATAKVALITET OG -MÆNGDE

Resultaterne af undersøgelsen skal give mulighed for en relevant analyse af koncentration/respons fremkommet med og uden bestråling og, hvis det er muligt, af den koncentration af kemisk stof, hvor cellelevedygtigheden reduceres til 50 % ($IC_{50}$). Hvis der påvises cytotoksicitet, skal både koncentrationsområdet og enkeltkoncentrationerne fastsættes på en sådan måde, at der kan tilpasses en kurve til forsøgsdataene.

Hvis resultaterne er enten klart positive eller klart negative (se punkt 2.3, første afsnit), vil første forsøg, der understøttes af et eller flere foreløbige eksperimenter til bestemmelse af dosisområde, være tilstrækkeligt.

▼B

Usikre og tvetydige resultater skal kontrolleres ved at gentage undersøgelsen (se også punkt 2.4, andet afsnit). I disse tilfælde kan det være påkrævet at ændre forsøgsbetingelserne for at opnå et klart resultat. Forsøgsbetingelser, der kan ændres, er bl.a. koncentrationsområde, inkubationstid før bestråling og eksponeringstid. En kortere eksponeringstid kan være relevant for stoffer, der er ustabile i vandig opløsning.

2.2. EVALUERING AF RESULTATERNE

Til evaluering af resultaterne kan der beregnes en fotoirritationsfaktor (PIF) eller en gennemsnitlig lyseffekt (MPE).

Ved beregning af parametrene for fotocytotoksicitet (se nedenfor) skal de spredte koncentration-responsværdier tilnærmes en passende kontinuerlig koncentration-responskurve (model). Kurven tilnærmes normalt til dataene ved hjælp af en ikke-lineær regressionsmetode (18). For at kunne vurdere virkningen af dataafvigelser på den tilpassede kurve anbefales det at gennemføre en bootstrap-proces.

Fotoirritationsfaktoren (PIF) beregnes ved hjælp af følgende formel:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Hvis der ikke kan beregnes en $IC_{50}$ med eller uden lys, kan der ikke fastlægges en PIF for testmaterialet. Den gennemsnitlige lyseffekt (MPE) er baseret på en sammenligning af de færdige koncentrationsresponskurver (19). Den defineres som et vægtet gennemsnit af repræsentative sæt af lyseffektværdier:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Lyseffekten $PE_C$ ved en given koncentration C defineres som produktet af responseffekt $RE_C$ og dosiseffekt $DE_C$ dvs. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Responseffekt $RE_C$ er forskellen mellem den konstaterede respons med og uden lys, dvs. $RE_C = R_c$ (–Irr) – $R_c$ (+Irr). Dosiseffekten beregnes ved hjælp af:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

hvor C* repræsenterer ækvivalenskoncentrationen, dvs. den koncentration, hvor et +Irr respons svarer til et –Irr respons ved koncentration C. Hvis C* ikke kan bestemmes, fordi responsværdierne i +Irr kurven systematisk er højere eller lavere end RC (–Irr), sættes dosiseffekten til 1. Vægtningsfaktorerne $w_i$ fremkommer ved den højeste responsværdi, dvs. $w_i$ = MAX {$R_i$ (–Irr), $R_i$ (-Irr) }. Koncentrationstabellen C; udvælges, så der er lige mange punkter i hvert af de koncentrationsintervaller, som de koncentrationsværdier, der anvendes i eksperimentet, afgrænser. Beregningen af MPE er begrænset til den højeste koncentrationsværdi, hvor mindst en af de to kurver udviser en responsværdi på mindst 10 %. Hvis denne højeste koncentration er højere end den højeste koncentration, der er blevet anvendt i +Irr-forsøget, sættes den resterende del af +Irr-kurven til responsværdien »0«. Afhængigt af om MPE-værdien er større end en korrekt udvalgt skæringsværdi ($MPE_C$ = 0,15) eller ej, klassificeres stoffet som fototoksisk.

▼B

En softwarepakke til beregning af PIF og MPE kan bestilles hos (20).

2.3. FORTOLKNING AF RESULTATER

På grundlag af valideringsundersøgelsen (8) vil et teststof med en PIF < 2 eller en MPE < 0,1 give resultatet: »ingen fototoksicitet«. En PIF > 2 men < 5 eller en MPE > 0,1 men < 0,15 vil give resultatet: »sandsynlig fototoksicitet«, og en PIF > 5 eller en MPE > 0,15 vil give resultatet: »fototoksicitet«.

Alle laboratorier, der starter brug af denne test op, skal undersøge de referencematerialer, der er opstillet i tabel 1, inden de begynder at teste stoffer for fototoksicitet. PIF- eller MPE-værdier skal ligge tæt op ad værdierne i tabel 1.

**Tabel 1**

| Kemisk betegnelse | EINECS nr. | CAS nr. | PIF | MPE | Absorptionsmaksima | Opløsningsmiddel (1) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Amiodaron HCl | 243-293-2 | [19774-82-4] | > 3,25 | 0,27 - 0,54 | 242 nm<br>300 nm<br>(skulder) | ethanol |
| Klorpromazin HCl | 200-701-3 | [69-09-0] | > 14,4 | 0,33 - 0,63 | 309 nm | ethanol |
| Norfloxacin | 274-614-4 | [70458-96-7] | > 71,6 | 0,34 - 0,90 | 316 nm | acetonitril |
| Anthracen | 204-371-1 | [120-12-7] | > 18,5 | 0,19 - 0,81 | 356 nm | acetonitril |
| Protoporphyrin IX, dinatrium | 256-815-9 | [50865-01-5] | > 45,3 | 0,54 - 0,74 | 402 nm | ethanol |
| L-Histidin | | [7006-35-1] | ingen PIF | 0,05 - 0,10 | 211 nm | vand |
| Hexachlorophen | 200-733-8 | [70-30-4] | 1,1 - 1,7 | 0,00 - 0,05 | 299 nm<br>317 nm<br>(skulder) | ethanol |
| Natriumlaurylsulfat | 205-788-1 | [151-21-3] | 1,0 - 1,9 | 0,00 - 0,05 | ingen absorption | vand |

(1) Opløsningsmiddel anvendt til måling af absorption.

2.4. FORTOLKNING AF DATA

Hvis der kun kan konstateres fototoksiske virkninger ved den højeste testkoncentration (specielt i forbindelse med vandopløselige teststoffer), skal der indgå andre overvejelser i risikovurderingen. Det kan f.eks. være data om hudabsorption og ophobning af det kemiske stof i huden og/eller data fra andre test, f.eks. test af det kemiske stof in vitro i dyrehud eller human hud eller hudmodeller.

▼B

Hvis der ikke påvises nogen toksicitet (+Irr og –Irr), og hvis dårlig opløselighed har begrænset de mulige koncentrationer, kan man betvivle testens egnethed til det pågældende stof, og der bør gennemføres bekræftende undersøgelser baseret på en anden model.

3. **RAPPORTERING**

TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— identifikationsdata, trivialnavne, generiske navne og IUPAC- og CAS-nummer, hvis kendt

— fysiske egenskaber og renhedsgrad

— fysiske-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen

— absorptionsspektrum for UV/synligt lys

— stabilitet og foto stabilitet, hvis kendt.

Opløsningsmiddel:

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel

— teststoffets opløselighed i opløsningsmidlet

— mængden (i procent) af opløsningsmiddel i kulturmediet.

Celler:

— celletype og oprindelse

— fravær af mycoplasma

— antal cellegenerationer, hvis kendt

— cellernes strålingsfølsomhed målt med det strålingsudstyr, der anvendes i in vitro 3T3 NRU-fototoksicitetstesten.

Testbetingelser (1) ved *inkubation før og efter eksponering for kemikaliet:*

— type og sammensætning af dyrkningsmedium

— omstændigheder ved inkubationen ($C0_2$-koncentration, temperatur, fugtighed)

— varighed af inkubationen (før og efter eksponeringen for kemikaliet).

Testbetingelser (2) *ved eksponering for kemikaliet:*

— begrundelse for valg af koncentrationer af teststoffet både med og uden bestråling

— hvis stoffet er tungtopløseligt, og cytotoksicitet ikke er påvist: begrundelse for den største koncentration, der er anvendt ved undersøgelsen

— type og sammensætning af dyrkningsmedium (buffer-saltopløsning)

— varigheden af eksponering for det kemiske stof.

Testbetingelser (3) *ved bestråling:*

— begrundelse for valg af lyskilde

▼B

— producent og type af lyskilde og radiometer

— lyskildens spektrale strålingskarakteristik

— det anvendte filters transmissions-/absorptionskarakteristik

— det anvendte radio meters karakteristik og detaljeret beskrivelse af dets kalibrering

— afstanden mellem lyskilden og testsystemet

— UVA-strålingsintensiteten (irradians) for den pågældende afstand udtrykt i $mW/cm^2$

— varigheden af udsættelsen for UV/synligt lys

— UVA-dosis (strålingsintensitet × tid) udtrykt i $J/cm^2$

— temperaturen i cellekulturen under bestråling og den tilsvarende cellekultur, der samtidig opbevares i mørke.

Testbetingelser (4) ved *Neutral Red-levedygtighedstest:*

— sammensætning af Neutral Red-mediet

— varigheden af inkubationen med Neutral Red

— omstændigheder ved inkubationen ($C0_2$-koncentration, temperatur, fugtighed)

— omstændigheder ved ekstraktion af Neutral Red (ekstraktionsmiddel, varighed)

— bølgelængde anvendt ved den spektrofotometriske aflæsning af OD for Neutral Red

— eventuel sekundær bølgelængde (reference)

— indhold af spektrofotometers eventuelle negative kontroller.

Resultater:

— cellelevedygtighed for hver koncentration af teststoffet udtrykt som en procentdel af levedygtigheden i kontrolkulturerne

— koncentrations-/responskurver (koncentration af teststoffet over for den relative cellelevedygtighed) fremkommet i samhørende +Irr og –Irr eksperimenter

— analyse af data af koncentrations-/responskurverne: hvis muligt beregning/kalkulation af $IC_{50}$ (+Irr) og $IC_{50}$ (–Irr)

— sammenligning af de to koncentrations-/responskurver, som er fremkommet med og uden bestråling, enten ved beregning af fotoirritationsfaktor (PIF) eller ved beregning af den gennemsnitlige lyseffekt (MPE)

— kriterier for accept af test, samtidig negativ kontrol

— absolut levedygtighed (OD af Neutral Red-ekstrakt) for bestrålede og ikke-bestrålede celler

— forklarende data for den negative kontrol, gennemsnit og standardafvigelse

— kriterier for accept af test, samtidig positiv kontrol

▼B

— IC50(+Irr) og $IC_{50}$(–Irr) og PIF/MPE for den positive kontrols kemiske stof

— forklarende data for den positive kontrols kemiske stof: $IC_{50}$(+Irr) og $IC_{50}$(–Irr) og PIF/MPE, gennemsnit og standardafvigelse.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In »Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry« Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314-348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In »The science of Photobiology« Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 »Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water« Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Doring, B., Holzhiitter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhutter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA/n *vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett, 24, 119-124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In »Dermatotoxicology«, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographie colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

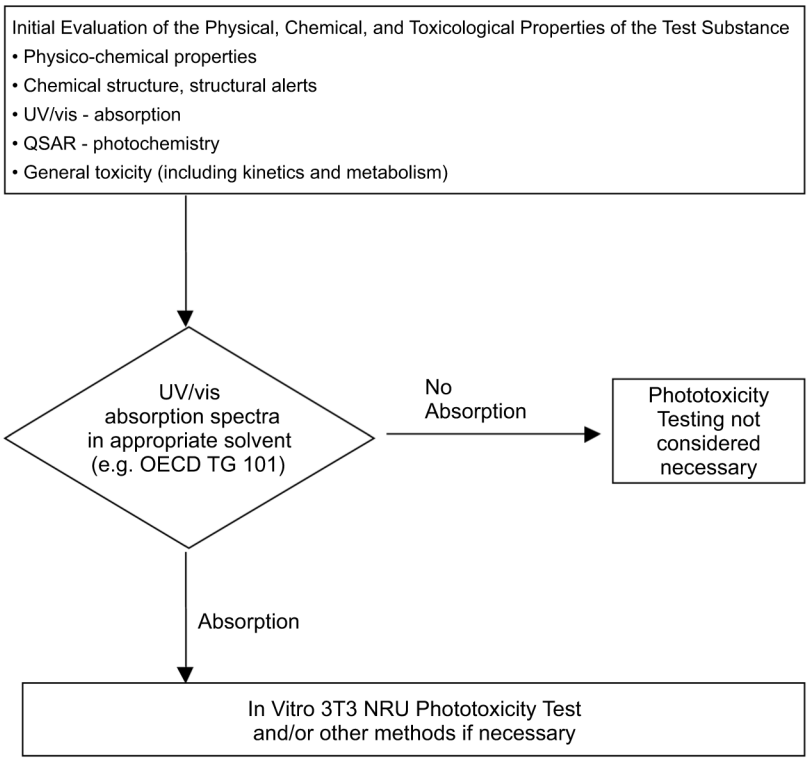
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

*BILAG 1*

**3T3 NRU PT's rolle i forhold til de forskellige trin i fototoksicitetstest af kemikalier**

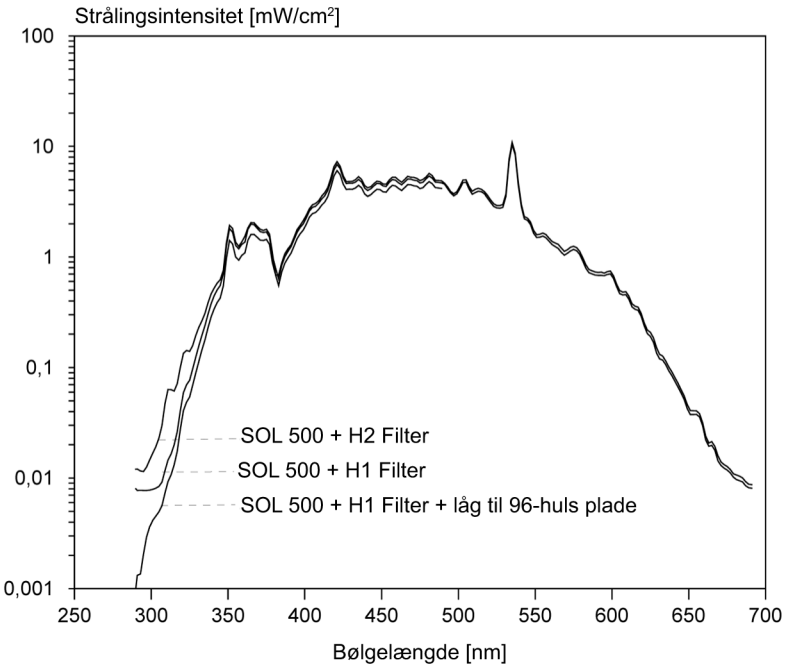


▼B

*BILAG 2*

*Figur 1*

**Spektraleffektfordeling i en filtreret solsimulator**




(Se punkt 1.4.1.5, andet afsnit)

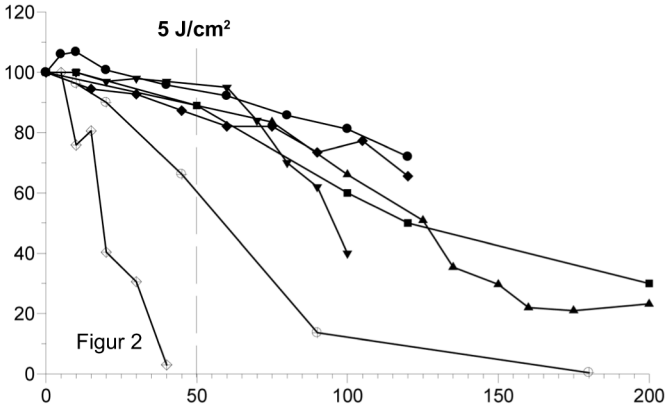
Figur 1 viser et eksempel på en acceptabel spektralintensitetsfordeling i en filtreret solsimulator. Målingerne er fra den doterede metalhalogenidkilde, der anvendes i valideringstesten i 3T3 NRU PT (6)(8)(17). Kurverne viser to forskellige filtres virkning og den supplerende filtereffekt af låget på en 96-huls cellekulturplade. H2-filter blev kun anvendt i forbindelse med testsystemer, der tolererer en større mængde UVB (test med hudmodel og fotohæmolysetest af røde blodlegemer). I 3T3 NRU-PT blev H1-filteret anvendt. Af figuren fremgår, at supplerende filtreringseffekt fra pladelåget hovedsagelig konstateres i UVB-området, hvor det tillader tilstrækkeligt UVB i bestrålingsspektret til at excitere kemikalier, der typisk absorberer i UVB-området, som f.eks. Amiodaron (se tabel 1).

▼B

*Figur 2*

**Balb/c 3T3-cellers bestrålingsfølsomhed (målt i UVA-området)**

Cellelevedygtighed ( % Neutral Red-optagelse i mørkekontroller)




bestrålingstid (minutter)

(10 min = 1 joule UVA/cm²)

(se punkt 1.4.1.5.2, andet afsnit, samt punkt 1.4.2.2.1 og 1.4.2.2.2)

Balb/c 3T3-cellers følsomhed for bestråling med solsimulatoren under valideringstesten af 3T3 NRU-fototoksicitetstesten målt i UVA-området. Figuren viser de resultater, man kom frem til i syv forskellige laboratorier forud for valideringsundersøgelsen (1). De to kurver med åbne symboler repræsenterer gamle celler (stort antal cellegenerationer), der måtte udskiftes med nye celler, og kurverne med udfyldte symboler viser celler med acceptabel bestrålingstolerance.

På baggrund af disse data blev den højeste ikke-cytotoksiske bestrålingsdosis på 5 J/cm$^2$ fastlagt (lodrette stiplede linje). Den vandrette stiplede linje viser den maksimale acceptable bestrålings-effekt, der omtales i punkt 1.4.2.2.

▼M3

B.42. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder baseret på denne vejledning bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429, kapitel B.42 i dette bilag), er allerede blevet vedtaget (1). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Den ajourførte LLNA er baseret på en evaluering af erfaringerne og videnskabelige data (12). Der er tale om endnu en TM til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I den anden TM (dvs. OECD Test Guideline 406, kapitel B.6 i dette bilag) anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehlertesten (13). LLNA har visse fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (13), hvad angår dyrevelfærd. Denne ajourførte LLNA-TM rummer et sæt ydeevnestandarder (tillæg 1) til brug for vurdering af valideringsstatus for nye og/eller modificerede testmetoder, som funktionelt og mekanisk svarer til LLNA, i overensstemmelse med principperne i OECD Guidance Document No. 34 (14).

2. LLNA består i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Det skal bemærkes, at de let til moderat sensibiliserende stoffer, der anbefales som velegnede positive kontrolstoffer (PC) ved marsvineforsøg (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) også er egnede til brug i forbindelse med LLNA (6) (8) (15). En reduceret version af LLNA (rLLNA), hvor der anvendes op til 40 % færre dyr, er også beskrevet som en mulighed i denne TM (16) (17) (18). rLLNA kan anvendes, når det er lovgivningsmæssigt nødvendigt at bekræfte en negativ forudsigelse af et potentielt hudsensibiliserende stof, forudsat at alle andre LLNA-protokolspecifikationer overholdes som beskrevet i denne TM. En forudsigelse af et negativt resultat bør være baseret på alle foreliggende oplysninger som beskrevet i punkt 4. Inden anvendelsen af rLLNA-metoden skal der fremlægges klare begrundelser og et klart videnskabeligt rationale derfor. Hvis der imod forventning opnås et positivt eller tvetydigt resultat i rLLNA, kan det være nødvendigt at foretage yderligere forsøg for at fortolke eller uddybe resultatet. rLLNA bør ikke anvendes til fareidentifikation af hudsensibiliserende teststoffer, når der er brug for oplysninger om dosis-responsforholdet såsom underinddeling i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og FN's globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier.

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 2.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA er en alternativ metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier. Dette indebærer ikke, at LLNA i alle tilfælde bør benyttes i stedet for marsvinetesten (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ, for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse. Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets

▼M3

fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i betragtning ved vurderingen af, om LLNA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA — se punkt 5) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske det nødvendige antal dyr til dette formål. Desuden repræsenterer LLNA en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på. LLNA er baseret på immunologiske hændelser, som udløses af kemikalier i induktionsfasen af sensibiliseringen. I modsætning til marsvinetest, (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) kræver LLNA ikke, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. Desuden kræver LLNA ikke anvendelse af et adjuvans, således som det er tilfældet for maksimeringstesten på marsvin (13). LLNA mindsker således dyrenes lidelser. Trods LLNA's fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 må man have for øje, at metoden har visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige (13) (f.eks. falsk negative resultater i LLNA for visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (19) (20) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (21), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13). I lyset af den begrænsede valideringsdatabase primært bestående af pesticidformuleringer er der endvidere større sandsynlighed for, at LLNA giver et positivt resultat i forbindelse med disse typer teststoffer (22) i forhold til marsvinetesten. I forbindelse med testning af formuleringer kan man imidlertid overveje at inkludere lignende stoffer med kendte resultater som referencestoffer for at påvise, at LLNA fungerer korrekt (se punkt 16). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA kunne anvendes til testning af alle stoffer, medmindre disse stoffer har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA-metodens nøjagtighed.

TESTPRINCIPPET

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst tre, før teststoffet kan klassificeres som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af in vivo radioaktiv mærkning til måling af øget celleproliferation i de drænende aurikulære lymfeknuder. Andre endepunkter til bedømmelse af antallet af celler under formering kan imidlertid anvendes, forudsat af ydeevnestandarderne opfyldes fuldt ud (tillæg 1).

▼M3

BESKRIVELSE AF ASSAYET

**Valg af dyreart**

7. Mus må foretrækkes til denne test. Der anvendes unge voksne hunmus af stamme CBA/Ca eller CBA/J, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i LLNA-respons.

**Miljøbetingelser og fodring**

8. Mus bør anbringes i grupper (23), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

**Forberedelse af dyrene**

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

**Fremstilling af forsøgsopløsninger**

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

**Pålidelighedskontrol**

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed som et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. Det anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 3 større end i den

▼M3

negative kontrolgruppe. PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 20 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 101-86-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v) og 5 % mercaptobenzothiazol (CAS nr. 149-30-4) i *N,N*-dimethylformamid (se tillæg 1, tabel 1). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA (dvs. udfører LLNA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en procedureændring af LLNA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (12).

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (24). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type teststoffers potentiale for hudsensibilisering korrekt. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

▼M3

TESTPROCEDURE

**Antal dyr og dosisniveauer**

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-14). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning (3) og (5). Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (3) (25). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (19), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 35). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppen, når der indsamles data for de enkelte dyr (12). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Nogle tilsynsmyndigheder accepterer imidlertid poolede data, og i disse tilfælde kan brugerne vælge at indsamle data for de enkelte dyr eller poolede data.

**Prescreening**

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

▼M3

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 6). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (25). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis) og på dag 6. På dag 6 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på ≥ 3 og/eller en forøgelse af øretykkelsen på ≥ 25 % på måledagen (26) (27). Den højeste dosis i LLNA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

*Tabel 1*

**Erytemscorer**

| Observation | Score |
|---|---|
| Intet erytem | 0 |
| Meget let erytem (knapt diagnosticerbart) | 1 |
| Veldefineret erytem | 2 |
| Moderat til svært erytem | 3 |
| Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet | 4 |

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (26) (27) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (30) (32) (33) (34).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (35) (36), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA-hovedundersøgelsen: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 6 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (37).

▼M3

**Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen**

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15)

— *Dag 2 og 3:* Påføringen fra dag 1 gentages.

— *Dag 4 og 5:* Ingen behandling.

— *Dag 6:* Hvert dyrs vægt registreres. 250 µl sterilt phosphatbufferet saltopløsning (PBS) indeholdende 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) tritieret ($^3$H)-methylthymidin injiceres i alle testdyr og kontroldyr gennem halevenen. Alternativt injiceres 250 µL sterilt phosphatbufferet saltopløsning (PBS) indeholdende 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) $^{125}$I-iododeoxyuridin og $10^{-5}$M fluordeoxyuridin i alle dyr gennem halevenen. Fem timer (5 t) senere aflives dyrene. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og pooles i PBS for hvert dyr (enkeltdyrsmetode). Alternativt eksciseres og pooles lymfeknuderne fra hvert øre i PBS for hver behandlingsgruppe (metode med poolet behandlingsgruppe). Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (12). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

**Fremstilling af cellesuspensioner**

26. En enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC), eksciseret bilateralt ved hjælp af enkeltdyrsmetoden eller alternativt ved hjælp af metoden med poolet behandlingsgruppe, fremstilles ved forsigtig mekanisk disaggregering gennem 200 µm trådnet af rustfrit stål eller en anden acceptabel teknik til fremstilling af en enkeltcellesuspension. Lymfeknudecellerne vaskes to gange med overskud af saltvand med phosphatbuffer, og dna fældes med 5 % trichloreddikesyre (TCA) ved 4 °C i 18 timer (3). De dannede pellets genopslæmmes enten i 1 ml TCA og overføres til scintillationsglas indeholdende 10 ml scintillatorvæske til $^3$H-tælling, eller overføres direkte i gammatælleglas til tælling af $^{125}$I.

**Bestemmelse af celleproliferationen (optagen radioaktivitet)**

27. Optagelsen af $^3$H-methylthymidin måles ved β-scintillationstælling som antal disintegrationer pr. minut (DPM). Optagelsen af $^{125}$I-ioddeoxyuridin måles ved $^{125}$I-tælling og angives også som DPM. Afhængigt af den valgte metode angives optagelsen som DPM/dyr (individuel metode) eller DPM/behandlingsgruppe (poolet metode).

**Reduceret LLNA**

28. I visse situationer, når det er lovgivningsmæssigt nødvendigt at bekræfte en negativ forudsigelse af et potentielt hudsensibiliserende stof, kan der anvendes en frivillig rLLNA-protokol (16) (17) (18), hvor der anvendes færre dyr, forudsat at alle andre LLNA-protokolspecifikationer overholdes som beskrevet i denne TM. Inden anvendelsen af rLLNA-metoden skal der fremlægges klare begrundelser og et klart videnskabeligt rationale derfor. Hvis der opnås et positivt eller tvetydigt resultat, kan det være nødvendigt at foretage yderligere forsøg for at fortolke eller uddybe resultatet.

▼M3

29. Det reducerede antal dosisgrupper er den eneste forskel mellem LLNA- og rLLNA-testprotokollerne, og rLLNA tilvejebringer derfor ikke oplysninger om dosis-responsforholdet. rLLNA bør derfor ikke anvendes, når der er behov for oplysninger om dosis-responsforholdet. Som ved flerdosis-LLNA skal den teststofkoncentration, der evalueres i rLLNA, være den maksimale koncentration, som ikke inducerer åbenbar systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen (se punkt 18).

OBSERVATIONER

**Kliniske observationer**

30. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (37).

**Kropsvægt**

31. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

32. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som stimulationsindeks (SI). Ved enkeltdyrsmetoden fås SI-værdien ved at dividere den gennemsnitlige DPM/dyr fra hver stoftestgruppe og PC-gruppen med den gennemsnitlige DPM/mus fra opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1. Ved metoden med poolet behandlingsgruppe fås SI ved division af den poolede optagelse af radioaktivitet for hver behandlingsgruppe med den poolede optagelse for VC-gruppen. Resultatet er den gennemsnitlige SI-værdi.

33. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 3. Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat anses for at være positivt (4) (5) (6).

34. Hvis det er nødvendigt at uddybe de opnåede resultater, bør teststoffets forskellige egenskaber tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (7).

35. Indsamling af data om radioaktivitet for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende VC-gruppe). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

▼M3

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

36. Data opstilles i tabelform. Ved enkeltdyrsmetoden angives de individuelle DPM-værdier, gruppens gennemsnitlige DPM/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende VC-gruppe. Ved metoden med poolet behandlingsgruppe vises den gennemsnitlige/mediane DPM og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende VC-gruppe.

**Testrapport**

37. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse).

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

▼M3

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— en tabel med individuelle (enkeltdyrsmetode) eller gennemsnitlige/mediane (metode med poolet behandlingsgruppe) DPM-værdier og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for DPM/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe ved enkeltdyrsmetoden

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne ved enkeltdyrsmetoden

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol*., 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol*., 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol*., 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol*., 36, 327-33.

▼M3

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol*., 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol*., 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

▼M3

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Available at: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [ http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol*., 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth*., 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

*Tillæg 1*

**Ydeevnestandarder til brug for vurdering af foreslåede lignende eller modificerede LLNA-testmetoder til bedømmelse af hudsensibilisering**

INDLEDNING

1. Formålet med ydeevnestandarder er at fastslå grundlaget for bedømmelsen af nye testmetoder, både beskyttede (dvs. ophavsretsbeskyttede, varemærkebeskyttede og registrerede) og ikkebeskyttede, som værende tilstrækkelig nøjagtige og pålidelige til bestemte testformål. Disse ydeevnestandarder for validerede og anerkendte testmetoder kan anvendes til at evaluere pålideligheden og nøjagtigheden af andre lignende metoder (i daglig tale »me-too«-test), som er baseret på lignende videnskabelige principper, og til at måle eller forudsige den samme biologiske eller toksiske effekt (14).

2. Inden indførelsen af modificerede metoder (dvs. foreslåede potentielle forbedringer af en godkendt testmetode) skal der foretages en bedømmelse af de foreslåede ændringers effekt på testresultatet og af, i hvilket omfang disse ændringer berører de oplysninger, der er tilgængelige for de øvrige dele i valideringsprocessen. Afhængigt af antallet og arten af de foreslåede ændringer, de genererede data og støttedokumentation for disse ændringer, skal de enten underkastes den samme valideringsproces som beskrevet for en ny test eller, hvis det er hensigtsmæssigt, en begrænset vurdering af pålideligheden og relevansen på grundlag af anerkendte ydeevnestandarder (14).

3. Lignende eller modificerede metoder, der foreslås anvendt i forbindelse med denne TM, skal vurderes med hensyn til pålidelighed og nøjagtighed ved hjælp af kemikalier, der repræsenterer hele LLNA-pointskalaen. For at undgå unødvendig brug af dyr opfordres metodeudviklere på det kraftigste til at rådføre sig med de kompetente myndigheder inden iværksættelsen af valideringsundersøgelser i overensstemmelse med ydeevnestandarderne og vejledningen i denne TM.

4. Disse harmoniserede ydeevnestandarder er baseret på de harmoniserede ydeevnestandarder US-ICCVAM, EU-ECVAM og japanske JaCVAM (12) for vurdering af validiteten af lignende eller modificerede versioner af LLNA. Ydeevnestandarderne indeholder de centrale dele af testmetoden, anbefalede referencekemikalier og standarder for nøjagtighed og pålidelighed, som den foreslåede metode som minimum skal opfylde.

I. **Centrale dele af testmetoden**

5. For at sikre, at en lignende eller modificeret LLNA-metode funktionelt og mekanisk svarer til LLNA og måler den samme biologiske effekt, skal følgende dele inkluderes i testprotokollen:

— Teststoffet skal påføres begge musens ører.

— Lymfocytproliferationen måles i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet.

— Lymfocytproliferationen måles i induktionsfasen i hudsensibilisering.

▼M3

— For teststoffer skal den højeste dosis være den maksimale koncentration, som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen. For positive referencekemikalier skal den højeste dosis være mindst lige så høj som de tilsvarende referencekemikaliers EC3-værdier i LLNA (se tabel 1) uden at inducere systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation hos musen.

— Alle undersøgelser skal omfatte en sideløbende vehikelkontrol, og når det er relevant, foretages der også en sideløbende positiv kontrol.

— Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe.

— Der indsamles data for de enkelte dyr eller poolede data.

Hvis nogle af disse kriterier ikke opfyldes, kan disse ydeevnestandarder ikke anvendes til validering af den lignende eller modificerede metode.

II. **Minimumsliste over referencekemikalier**

6. I de harmoniserede ydeevnestandarder US-ICCVAM, EU-ECVAM og japanske JaCVAM (12) er der blevet identificeret 18 referencekemikalier, der som minimum skal anvendes, og fire valgfrie referencekemikalier (dvs. stoffer, der gav enten falsk positive eller falsk negative resultater i LLNA sammenholdt med resultaterne af forsøg med mennesker og marsvin (B.6 eller OECD Test Guideline 406) (13), og således gør det muligt at påvise en tilsvarende eller bedre ydeevne end LLNA), som er inkluderet i LLNA-ydeevnestandarderne. Kriterierne for udvælgelse af disse kemikalier var:

— Listen over referencekemikalier indeholdt den type stoffer, der typisk testes for potentiale for hudsensibilisering, og det responsområde, som kan måles eller forudsiges i LLNA.

— Stofferne havde veldefinerede kemiske strukturer.

— LLNA-data fra marsvinetest, (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13) og (hvis muligt) data for mennesker var tilgængelige for hvert stof.

— Stofferne var gængse.

De anbefalede referencekemikalier er angivet i tabel 1. Studier baseret på de anbefalede referencekemikalier evalueres i det vehikel, som er angivet i tabel 1. Hvis et stof på listen ikke kan fås, kan der benyttes andre stoffer, som opfylder de nævnte udvælgelseskriterier, hvis der gives tilstrækkelig begrundelse.

▼M3

*Tabel 1*

**Anbefalede referencekemikalier for LLNA-ydeevnestandarderne**

| Antal | Kemikalier ([1]) | CAS-nr. | Form | Veh ([2]) | EC3 % ([3]) | N ([4]) | 0,5x – 2,0x EC3 | EC3-interval | LLNA vs. marsvin | LLNA vs. human |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5-chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (CMI)/2-methyl-4-isothiazolin-3-on (MI) ([5]) | 26172-55-4/2682-20-4 | Fly. | DMF | 0,009 | 1 | 0,0045-0,018 | IB | +/+ | +/+ |
| 2 | DNCB | 97-00-7 | Fast | AOO | 0,049 | 15 | 0,025-0,099 | 0,02-0,094 | +/+ | +/+ |
| 3 | 4-phenylendiamin | 106-50-3 | Fast | AOO | 0,11 | 6 | 0,055-0,22 | 0,07-0,16 | +/+ | +/+ |
| 4 | Cobaltchlorid | 7646-79-9 | Fast | DMSO | 0,6 | 2 | 0,3-1,2 | 0,4-0,8 | +/+ | +/+ |
| 5 | Isoeugenol | 97-54-1 | Fly. | AOO | 1,5 | 47 | 0,77-3,1 | 0,5-3,3 | +/+ | +/+ |
| 6 | 2-mercaptobenzothiazol | 149-30-4 | Fast | DMF | 1,7 | 1 | 0,85-3,4 | IB | +/+ | +/+ |
| 7 | Citral | 5392-40-5 | Fly. | AOO | 9,2 | 6 | 4,6-18,3 | 5,1-13 | +/+ | +/+ |
| 8 | Hexachloraceton | 101-86-0 | Fly. | AOO | 9,7 | 21 | 4,8-19,5 | 4,4-14,7 | +/+ | +/+ |
| 9 | Eugenol | 97-53-0 | Fly. | AOO | 10,1 | 11 | 5,05-20,2 | 4,9-15 | +/+ | +/+ |
| 10 | Phenylbenzoat | 93-99-2 | Fast | AOO | 13,6 | 3 | 6,8-27,2 | 1,2-20 | +/+ | +/+ |
| 11 | Kanelalkohol | 104-54-1 | Fast | AOO | 21 | 1 | 10,5-42 | IB | +/+ | +/+ |
| 12 | Imidazolidinyl urea | 39236-46-9 | Fast | DMF | 24 | 1 | 12-48 | IB | +/+ | +/+ |
| 13 | Methylmethacrylat | 80-62-6 | Fly. | AOO | 90 | 1 | 45-100 | IB | +/+ | +/+ |
| 14 | Chlorbenzen | 108-90-7 | Fly. | AOO | 25 | 1 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/– | –/ (*) |
| 15 | Isopropanol | 67-63-0 | Fly. | AOO | 50 | 1 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/– | –/+ |

▼M3

| Antal | Kemikalier ([1]) | CAS-nr. | Form | Veh ([2]) | EC3 % ([3]) | N ([4]) | 0,5x – 2,0x EC3 | EC3-interval | LLNA vs. marsvin | LLNA vs. human |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | Mælkesyre | 50-21-5 | Fly. | DMSO | 25 | 1 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/– | –/ (*) |
| 17 | Methylsalicylat | 119-36-8 | Fly. | AOO | 20 | 9 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/– | –/– |
| 18 | Salicylsyre | 69-72-7 | Fast | AOO | 25 | 1 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/– | –/– |
| Frivillige stoffer til påvisning af forbedret ydeevne i forhold til LLNA | | | | | | | | | | |
| 19 | Natriumlaurylsulfat | 151-21-3 | Fast | DMF | 8,1 | 5 | 4,05-16,2 | 1,5-17,1 | +/– | +/– |
| 20 | Ethylenglycoldimethacrylat | 97-90-5 | Fly | MEK | 28 | 1 | 14-56 | IB | +/– | +/+ |
| 21 | Xylen | 1330-20-7 | Fly | AOO | 95,8 | 1 | 47,9-100 | IB | +/ (**) | +/– |
| 22 | Nikkelchlorid | 7718-54-9 | Fast | DMSO | 5 | 2 | Ikke relevant | Ikke relevant | –/+ | –/+ |

Forkortelser: AOO = acetone: olivenolie (4:1, v/v); CAS-nr. = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimethylformamid; DMSO = dimethylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlorobenzen; EC3 = den estimerede koncentration, der skal til for at fremkalde en tre gange stigning i stimulationsindekset; Marsvin = marsvinetestresultat (dvs. B.6 eller OECD Test Guideline 406) (13); HCA = hexylkanelaldehyd; Fly = flydende; LLNA = resultat af assay på lokale lymfeknuder i mus (dvs. B.42 eller OECD Test Guideline 429) (1); MEK = methylethylketon; NA = ikke relevant, da stimulationsindekset er < 3; IB = ikke beregnet, da data hidrører fra en enkelt undersøgelse; Fast = faste; Veh = testvehikel.

(*) Antages ikke at være et sensibiliserende stof for mennesker, da der ikke blev fundet nogen kliniske lappetestresultater, det er ikke inkluderet som et lappetestkit til påvisning af allergi, og der blev ikke fundet nogen caserapporter om human sensibilisering.

(**) Der foreligger ingen data fra marsvinetest.

([1]) Kemikalier fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

([2]) Som følge af den potentielle indvirkning af forskellige vehikler på LLNA's ydeevne bør det anbefalede vehikel for hvert referencekemikalie anvendes (24) (32).

([3]) Middelværdi, hvor der var mere end en EC3-værdi. For negative stoffer (dvs. med stimulationsindeks < 3) angives den højeste testede koncentration.

([4]) Antal LLNA-undersøgelser, som dataene hidrører fra.

([5]) Forhandles under betegnelsen Kathon CG (CAS-nr. 55965-84-9), der er en blanding af CMI og MI i forholdet 1:3. De relative koncentrationer af hver komponent ligger i intervallet 1,1 % til 1,25 % (CMI) og 0,3 % til 0,45 % (MI). De inaktive komponenter er magnesiumsalte (21,5 % til 24 %) og kobbernitrat (0,15 % til 0,17 %), og resten af formuleringen er 74 % til 77 % vand. Kathon CG forhandles allerede gennem Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (nu Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Fastlagte standarder for nøjagtighed og pålidelighed**

7. Nøjagtigheden af en lignende eller modificeret LLNA-metode skal som minimum være den samme som for LLNA-ydeevnestandarderne, når den vurderes på grundlag af de 18 referencekemikalier, der som minimum skal anvendes. Den nye eller modificerede metode skal resultere i en korrekt klassificering baseret på en »ja/nej«-afgørelse. Alle de referencekemikalier, der som minimum skal anvendes, klassificeres ikke altid korrekt ved den nye eller modificerede metode. Hvis et af de milde sensibiliserende stoffer f.eks. blev klassificeret forkert, kan en begrundelse for fejlklassificeringen og relevante supplerende data (f.eks. testresultater med korrekte klassificeringer af andre stoffer med samme fysiske, kemiske og sensibiliserende egenskaber som det fejlklassificerede referencekemikalie) anses som dokumentation for samme ydeevne. I så fald vurderes valideringsstatus for den nye eller modificerede LLNA-testmetode fra sag til sag.

*Reproducerbarhed inden for laboratorier*

8. Ved bestemmelse af reproducerbarheden inden for laboratorier skal en ny eller modificeret LLNA-metode vurderes ved hjælp af et sensibiliserende stof, som er velkarakteriseret i LLNA. LLNA-ydeevnestandarderne er således baseret på de variable resultater af gentagne test af hexylkanelaldehyd (HCA). Ved vurdering af pålideligheden inden for laboratorier skal de beregnede koncentrationstærskelværdier (ECt-værdier) for HCA udledes fire gange med mindst en uges mellemrum mellem forsøgene. Reproducerbarheden inden for laboratorier er acceptabel, hvis laboratoriet i hver HCA-test kan opnå ECt-værdier på mellem 5 % og 20 %, hvilket udgør 0,5-2 gange den EC3-middelværdi, der er specificeret for HCA (10 %) i LLNA (se tabel 1).

*Reproducerbarhed mellem laboratorier*

9. Ved bedømmelsen af reproducerbarheden mellem laboratorier skal en ny eller modificeret LLNA-metode vurderes ved hjælp af to sensibiliserende stoffer, som er velkarakteriserede i LLNA. LLNA-ydeevnestandarderne er baseret på de variable resultater af HCA- og 2,4-dinitrochlorobenzen (DNCB)-test i forskellige laboratorier. ECt-værdierne afledes uafhængigt af en enkelt undersøgelse udført i mindst tre forskellige laboratorier. For at påvise, at reproducerbarheden mellem laboratorier er acceptabel, skal det enkelte laboratorium opnå ECt-værdier på 5 %-20 % og 0,025 %-0,1 % for DNCB, hvilket udgør 0,5-2 gange den EC3-middelværdi, der er specificeret for henholdsvis HCA (10 %) og DNCB (0,05 %) i LLNA (se tabel 1).

▼M3

*Tillæg 2*

**Definitioner**

Nøjagtighed: Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (14).

Referencestof: Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

Beregnet koncentrationstærskel (ECt): Beregnet koncentration af det teststof, der er påkrævet for at fremkalde et stimulationsindeks, der er indikativt for en positiv respons.

Beregnet koncentration tre (EC3): Beregnet koncentration af det teststof, der er påkrævet for at fremkalde et stimulationsindeks på tre.

Falsk negativ: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt.

Falsk positiv: Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt.

Fare: Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

Reproducerbarhed mellem laboratorier: Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (14).

Reproducerbarhed inden for laboratorier: Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (14).

Me-too-test: Gængs udtryk for en testmetode, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referencetestmetode. En sådan testmetode underkastes ofte en catch-up-validering. Benyttes som synonym for tilsvarende testmetode (14).

Outlier: En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

Ydeevnestandarder (PS): Standarder, som med udgangspunkt i en valideret testmetode giver mulighed for at vurdere, om en foreslået testmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De indeholder bl.a.: i) de centrale dele af testmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede testmetodes ydeevne er acceptabel, iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede testmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede testmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (14).

Beskyttet testmetode: En testmetode, hvor fremstilling og distribution er beskyttet af patenter, ophavsrettigheder, varemærker osv.

▼**M3**

Kvalitetssikring: En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

Referencekemikalier: Kemikalier, der anvendes i valideringsprocessen, hvor respons i in vitro eller in vivo-referencetestsystemet eller de pågældende arter allerede er kendt. Disse kemikalier skal være repræsentative for de kemiske stofgrupper, som testmetoden forventes at blive anvendt på, og skal repræsentere hele det forventede responsområde for de kemikalier, som den anvendes til, fra kraftig til svag eller negativ respons. Det kan være nødvendigt at anvende forskellige referencekemikalier i de forskellige faser i valideringsprocessen og til forskellige testmetoder og testformål (14).

Relevans: Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (14).

Pålidelighed: Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (14).

Hudsensibilisering: En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

Stimulationsindeks (SI): En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

Teststof (eller testkemikalie): Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

Valideret testmetode: En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål (14).

▼B

B.43. **NEUROTOKSICITETSUNDERSØGELSE I GNAVERE**

1. **METODE**

Metoden svarer til OECD TG 424 (1997).

Denne forsøgsmetode har til formål at give den nødvendige information for at kunne bekræfte eller nærmere karakterisere af den potentielle neurotoksicitet af kemiske stoffer i voksne dyr. Den kan enten kombineres med eksisterende metoder til toksicitetsundersøgelse ved gentagen indgift eller kan udføres som en separat undersøgelse. Det anbefales at konsultere OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) med henblik på design af undersøgelser baseret på denne testmetode. Navnlig er dette vigtigt, hvis man overvejer at ændre på de observationer og testprocedurer, som anbefales til rutinemæssig brug af metoden. Det nævnte Guidance Document er udarbejdet med henblik på at lette valget af andre testprocedurer til brug under givne omstændigheder.

Vurdering af udviklingsneurotoksicitet er ikke omfattet af denne metode.

1.1. INDLEDNING

Ved vurdering af kemiske stoffers toksiske egenskaber er det vigtigt, at potentialet for neurotoksiske virkninger tages i betragtning. I metoden til systemisk toksicitetsundersøgelse med gentagen indgift indgår allerede screening for neurotoksisk potentiale. Metoden kan benyttes til at fastlægge design for en undersøgelse, der supplerer eller bekræfter de neurotoksiske virkninger, som er set i undersøgelserne for systemisk toksicitet ved gentagen indgift. Når man betragter det neurotoksiske potentiale af visse kategorier af kemiske stoffer, kan disse tænkes at ville blive vurderet mere korrekt, hvis denne metode anvendes, uden at man på forhånd har fået nogen indikation af stoffernes neurotoksiske potentiale fra forsøg med systemisk toksicitet ved gentagen indgift. Sådanne betragtninger kan f.eks. bestå i.

— observation af neurologiske symptomer eller neuropatologiske forandringer i andre toksicitetsundersøgelser end forsøg med gentagen indgift, eller

— strukturelt slægtskab eller andre oplysninger, der kæder stofferne sammen med kendte neurotoksiske stoffer.

Derudover kan det i andre tilfælde være hensigtsmæssig at benytte denne metode; for nærmere enkeltheder henvises til (1).

Denne metode er udviklet således, at den kan tilpasses med henblik på at bekræfte givne histopatologiske og adfærdsmæssige neurotoksiske egenskaber ved et kemisk stof foruden at karakterisere og kvantificere den neurotoksiske respons.

▼B

Tidligere blev neurotoksicitet anset for at være ensbetydende med neuropati ledsaget af neuropatologiske forandringer eller af neurologisk dysfunktion, som f.eks. kramper, lammelse eller tremor. Skønt neuropati er en vigtig manifestation af neurotoksicitet, er det nu klart, at der er mange symptomer på toksisk effekt på nervesystemet (f.eks. nedsat motorisk koordination, nedsat sansefunktion, indlærings- og hukommelsesdysfunktion), som ikke nødvendigvis afspejler sig i neuropati eller i andre typer forsøg.

Denne neurotoksicitets-forsøgsmetode er udformet med henblik på at finde væsentlige neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske virkninger i voksne gnavere. Skønt adfærdspåvirkninger, også uden morfologiske forandringer, kan afspejle en negativ påvirkning af organismen, er det ikke alle adfærdsændringer, der er specifikke for nervesystemet. Derfor bør eventuelle observerede forandringer vurderes i sammenhæng med sideløbende histopatologiske, hæmotologiske og biokemiske data foruden data vedrørende andre former for systemisk toksicitet. I de test, der anvendes i denne metode til karakterisering og kvantificering af neurotoksisk respons, indgår specifikke histopatologiske og adfærdsmæssige metoder, som yderligere kan understøttes gennem elektrofysiologiske og/eller biokemiske undersøgelser (1)(2)(3)(4).

Neurotoksiske stoffer kan virke på en række steder i nervesystemet og ved forskellige mekanismer. Da der ikke findes nogen enkelt række test, der giver mulighed for tilbundsgående vurdering af det neurotoksiske potentiale af alle stoffer, kan det være nødvendigt at anvende andre in vivo- eller in vitro-test, som er specifikt rettet mod den observerede eller forventede form for neurotoksisk virkning.

Denne testmetode kan desuden, i forbindelse med den vejledning, der gives i OECD's Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1), anvendes tit nærmere karakterisering eller forbedring af følsomheden af kvantificeringen af dosis-responsforholdet med henblik på at kunne opstille et bedre skøn over No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), eller på at underbygge kendte eller formodede farer ved det kemiske stof. For eksempel kan der udformes undersøgelser til fastlæggelse og vurdering af neurotoksiske mekanismer eller supplering af de oplysninger, der allerede kan fås ved hjælp af grundlæggende neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske observationsmetoder. Sådanne undersøgelser behøver ikke dublere de data, der fås ved brug af de i denne metode anbefalede standardmetoder, når sådanne data allerede foreligger og ikke anses for nødvendige til fortolkning af undersøgelsens resultater.

Denne neurotoksikologiske undersøgelse, anvendt alene eller i kombination, giver oplysninger, som kan:

— fastslå, om nervesystemet påvirkes permanent eller reversibelt af det testede kemiske stof

— bidrage til karakterisering af de nervesystemforandringer, der er forbundet med udsættelse for det kemiske stof, og til forståelsen af den underliggende mekanisme

▼B

— fastlægge dosis- og tidsrespons-forholdet med henblik på bestemmelse af et skønnet niveau, der er uden observerede sundhedsmæssigt uønskede effekter, (og som kan danne grundlag for fastsættelse af sikkerhedsniveau for det kemiske stof).

I metoden administreres teststoffet oralt. Andre administrationsveje (f.eks. ved dermal applikation eller inhalation) kan være mere velegnede og kan kræve tilpasning af den anbefalede fremgangsmåde. Overvejelser vedrørende valg af administrationsvej bygger på stoffets profil med hensyn til eksponering af mennesker og på foreliggende toksikologiske og kinetiske oplysninger.

1.2. DEFINITIONER

**Sundhedsmæssigt uønsket virkning:** enhver sådan behandlingsrelateret afvigelse fra den normale variation, som forringer en organismes overlevelsesevne, reproduktionsevne eller tilpasningsevne til omgivelserne.

**Dosis:** den mængde teststof, som indgives. Dosis angives som vægtmængde (g, mg) teststof pr. vægtenhed forsøgsdyr (f.eks. mg/kg), eller som fast koncentration i føden (ppm).

**Dosering:** et generelt udtryk, som indbefatter dosis, doseringens hyppighed og anvendelsens varighed.

**Neurotoksicitet:** en negativ ændring i nervesystemets struktur eller funktion som følge af udsættelse for et kemisk, biologisk eller fysisk agens.

**Neurotoksisk agens:** ethvert kemisk, biologisk eller fysisk agens med potentiale til at fremkalde neurotoksicitet.

**NOAEL:** forkortelse for »no-observed-adverse-effect level«, dvs. det højeste dosisniveau, hvor der ikke observeres behandlingsrelaterede uønskede virkninger.

1.3. PRINCIP FOR TESTMETODEN

Teststoffet administreres oralt ved forskellige doser til forskellige grupper af gnavere. Normalt kræves gentagen dosering, og dosisregimet kan være 28 dages indgift, subkronisk (90 dage) eller kronisk (1 år eller længere). Procedurerne i denne testmetode kan ligeledes anvendes til et forsøg for akut neurotoksicitet. Dyrene testes, således at man kan påvise og karakterisere anomalier af adfærdsmæssig eller neurologisk art. I hver observationsperiode vurderes adfærden på en række punkter, som kan tænkes påvirket af neurotoksiske stoffer. Ved testens slutning bliver en undergruppe af dyr af hvert køn fra hver gruppe perfunderet in situ, og af hjerne, rygmarv og perifere nerver fremstilles snit, som undersøges.

Når undersøgelsen fungerer som enkeltstående undersøgelse til screening for neurotoksicitet eller til karakterisering af neurotoksiske virkninger, kan de dyr i hver gruppe, som ikke er anvendt til perfusion og efterfølgende histopatologisk undersøgelse (se tabel 1), anvendes til specifikke neuroadfærdsmæssige, neuropatolotiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, som kan supplere de data, man har fået ved hjælp af standardundersøgelserne i denne metode (1). Sådanne supplerende procedurer kan være særlig nyttige, når empiriske observationer eller forventede virkninger peger på neurotoksicitet af specifik art eller med et specifikt mål. Alternativt kan de tilbageværende dyr anvendes til vurderinger som f.eks. dem, der foreskrives i metoder til toksicitetsundersøgelser med gentagen indgift i gnavere.

▼B

Når procedurerne i denne forsøgsmetode kombineres med procedurerne i andre forsøgsmetoder, skal antallet af dyr være tilstrækkeligt til at opfylde kravene om observationer i begge undersøgelser.

1.4. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den foretrukne gnaverart er rotter, emn en anden gnaverart kan anvendes, når begrundelse herfor gives. Der anvendes unge raske dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. Doseringen skal normalt begynde snarest muligt efter fravænning, fortrinsvis senest ved seks ugers alderen, og under alle omstændigheder før ni ugers alderen. Når denne undersøgelse kombineres med andre undersøgelser, kan det dog være nødvendigt at tilpasse dette alderskrav. Ved forsøgets begyndelse må vægtvariationen mellem de anvendte dyr ikke være over 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn. Når en kortvarig toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering udføres som indledning til en langvarig undersøgelse, skal de anvendte dyr i de to undersøgelser være af samme stamme og oprindelse.

1.4.2. **Opstaldning og fodring**

Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Høj intermitterende støj skal holdes på et minimum. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand. Ved valg af foder kan der tages hensyn til nødvendigheden af at sikre passende iblanding af teststoffet, når denne administrationsmåde anvendes. Dyrene kan enten anbringes enkeltvis eller i bure med små grupper af samme køn.

1.4.3. **Klargøring af dyrene**

Unge raske dyr tilordnes behandlings- og kontrolgrupper på tilfældig måde. Burene arrangeres, så at eventuelle virkninger af burenes placering minimeres, Dyrene mærkes entydigt, så de enkelte dyr kan identificeres, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne.

1.4.4. **Indgiftsvej og fremstilling af doserne**

Metoden vedrører specifikt oral indgift af teststoffet. Oral indgift kan ske ved gavage, tilsætning til foder eller drikkevand, eller gennem kapsler. Der kan anvendes andre adrninistrationsveje (f.eks. dermal applikation eller inhalation), men i så fald kan det blive nødvendigt at tilpasse den anbefalede fremgangsmåde. I overvejelser vedrørende valg af administrationsvej indgår stoffets profil med hensyn til eksponering af mennesker og foreliggende toksikologiske og kinetiske oplysninger. Den valgte administrationsvej og deraf følgende ændringer af procedurerne i denne forsøgsmetode skal begrundes.

▼B

Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet vehikel. Det anbefales, at man som første valg vurderer muligheden af at benytte en vandig opløsning/suspension, efterfulgt af en opløsning/suspension i olie (f.eks majsolie), og derefter eventuel opløsning i andre vehikler. Vehiklets toksiske egenskaber skal være kendt. Derudover skal følgende egenskaber ved vehiklet tages i betragtning: dets effekt på teststoffets absorption, fordeling, metabolisme og retention med deraf følgende eventuel ændring af dettes toksiske egenskaber, og dets indvirkning på dyrenes føde- og vandindtagelse og ernæringstilstand.

1.5. PROCEDURER

1.5.1. **Dyrenes antal og køn**

Når undersøgelsen udføres som enkeltstående undersøgelse, skal der anvendes mindst 20 dyr (10 hunner og 10 hanner) i hver dosis- og kontrolgruppe til detaljeret klinisk og funktionsmæssig observation. Af disse 10 hanner og 10 hunner udvælges mindst fem hanner og fem hunner, som perfunderes in situ og gennemgår detaljeret neurohistopatologisk undersøgelse ved forsøgets afslutning. Når kun et begrænset antal dyr i en given dosisgruppe observeres for tegn på neurotoksiske virkninger, skal det overvejes at lade de pågældende dyr indgå blandt dem, der udvælges til perfusion. Når undersøgelsen udføres i kombination med en toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering, skal antallet af dyr være tilstrækkeligt til at opfylde målene i begge undersøgelser. Det minimale antal dyr i hver gruppe ved forskellige kombinationer af undersøgelser er givet i tabel 1. Hvis der planlægges interimsaflivninger eller restitutionsgrupper til observation for toksiske virkningers reversibilitet, persistens eller forsinkede indtræden efter behandling, eller hvis supplerende observationer overvejes, skal antal dyr øges, så der er tilstrækkeligt med dyr til rådighed for observation og histopatologisk undersøgelse.

1.5.2. **Behandlings- og kontrolgruppe**

Sædvanligvis skal der være mindst tre dosisgrupper og en kontrolgruppe, men hvis andre data ikke giver anledning til at forvente virkning af en gentagen dosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag, kan en grænsetest udføres. Foreligger der ikke egnede data, kan der udføres et dosistitreringsforsøg for at lette fastlæggelsen af de doser, der skal anvendes. Bortset fra behandling med teststof skal dyrene i kontrolgruppen håndteres på samme måde som dyrene i behandlingsgruppen. Anvendes vehikel til administration af teststoffet, skal dyrene i kontrolgruppen modtage vehiklet i den største anvendte volumen.

1.5.3. **Kvalitetskontrol**

Det laboratorium, som udfører undersøgelsen, skal fremlægge data, som godtgør laboratoriets egnethed til at udføre undersøgelsen og følsomheden af de anvendte metoder. Sådanne data skal dokumentere evnen til at påvise og, når det er hensigtsmæssigt, kvantificere ændringer i de forskellige effektparametre, som anbefales observeret, således autonome symptomer, sensorisk reaktionsformåen, gribestyrke af lemmerne og motorisk aktivitet. Oplysninger om kemiske stoffer, som fremkalder forskellige former for neurotoksisk respons og kan anvendes som positive kontrolstoffer, findes i henvisning (2) til (9). Historiske data kan anvendes, hvis den eksperimentelle metode i alt væsentligt er den samme. Jævnlig ajourføring af historiske data anbefales. Når forsøgslaboratoriet på væsentlige punkter ændrer udførelsen af forsøget eller procedurerne, skal der forelægges nye data, som godtgør metodernes fortsatte følsomhed.

▼B

1.5.4. **Valg af dosis**

Dosisniveauet vælges under hensyntagen til eventuelle foreliggende toksicitets- og kinetikdata for teststoffet og beslægtede stoffer. Det højeste dosisniveau vælges med henblik på at fremkalde neurotoksisk effekt eller tydelig systemisk toksisk effekt. Derefter vælges en aftagende række dosisniveauer, som giver mulighed for at påvise en eventuel dosisafhængig respons, og som laveste dosisniveau et niveau, hvor ingen skadelig effekt iagttages (NOAEL). I princippet skal dosisniveauerne fastsættes således, at de primære toksiske virkninger på nervesystemet kan skelnes fra virknigner knyttet til den systemiske toksicitet. I mange tilfælde vil to til tre intervaller være optimalt, og ofte må det foretrækkes at tilføje en fjerde behandlingsgruppe frem for at operere med meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisniveauerne. Når der foreligger et rimeligt skøn over den humane eksponering, må også dette tages i betragtning.

1.5.5. **Grænsetest**

Når et dosisniveau på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/døgn med de beskrevne metoder ikke fremkalder observerbar neurotoksisk virkning, og når heller ikke foreliggende data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede forbindelser giver anledning til at forvente nogen virkning, er et komplet forsøg med tre dosisniveauer ikke nødvendigvis påkrævet. Den forventede eksponering af mennesker kan betyde, at der anvendes et højere oralt dosisniveau i grænseforsøget. For andre indgiftsmåder — f.eks. inhalation eller dermal applikation — kan teststoffets fysisk-kemiske egenskaber ofte være bestemmende for det maksimale opnåelige eksponiringsniveau. Til brug for en oral akut undersøgelse bør dosis ved grænsetesten være mindst2 000 mg/kg.

1.5.6 **Administration af doserne**

Dyrene doseres med teststoffet dagligt syv dage om ugen i en periode af mindst 28 dage; bruges fem-dages dosisregime eller kortere eksponeringstid, skal dette begrundes, Administreres teststoffet ved gavage, skal det ske som enkeltdosis med gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Den maksimale væskemængde, som kan indgives ad gangen, afhænger af forsøgsdyret størrelse. Dette volumen må højst være 1 ml/100 g kropsvægt. Ved vandige opløsninger kan det dog overvejes at anvende indtil 2 ml/100 g kropsvægt. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, hvis effekt sædvanligvis forstærkes ved højere koncentration, skal variation af testvolumenet minimeres ved at justere koncentrationen, så volumenet er konstant ved alle dosisniveauer.

For teststoffer, som administreres i foderet eller drikkevandet, er det vigtigt at sikre, at det pågældende stof i den anvendte mængde ikke griber ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Ved indgift af teststoffet i foderet kan stoffet enten gives ved konstant koncentration i foderet (ppm) eller ved et konstant dosisniveau i forhold til dyrets kropsvægt; den anvendte mulighed skal specificeres. Ved indgift med sonde skal dosis gives på tilsvarende tidspunkt hver dag og efter behov justeres, så dosisniveauet holdes konstant i forhold til kropsvægten. Når der som indledning til en langtidsundersøgelse udføres et korttids-toksicitetsforsøg med gentagen dosering, skal der i de to undersøgelser anvendes ensartet foder. Når det i et akut toksicitetsforsøg ikke er muligt at indgive den pågældende stofmængde som en enkelt dosis, kan den undtagelsesvis administreres delt inden for en periode af højst 24 timer.

▼B

1.6. OBSERVATION

1.6.1. **Hyppighed af observationer og test**

I forsøg med gentagen dosering skal observationsperioden omfatte doseringsperioden. I akutte undersøgelser skal iagttages en 14-dages efterbehandlingsperiode. For dyr i satellitgrupper, som holdes uden eksponering i en efterbehandlingsperiode, skal observationerne ligeledes omfatte denne periode.

Observationerne skal finde sted tilstrækkelig hyppigt til at maksimere sandsynligheden for at påvise eventuelle adfærdsmæssige og/eller neurologiske anomalier. Observationerne skal fortrinsvis finde sted på samme tidspunkt hver dag, idet man retter sig efter tidspunktet for den forventede maksimale effekt af indgiften. I tabel 2 vises hyppigheden af de kliniske observationer og funktionsprøver. Hvis kinetiske eller andre data fra tidligere undersøgelser viser, at der bør benyttes andre tidspunkter til observationer, test eller post-observationsperioder, skal der benyttes en alternativ plan med henblik på at skaffe flest mulige oplysninger. Eventuelle ændringer af planen skal begrundes.

1.6.1.1. *Observationer af almindelig sundhedstilstand og mortalitet/morbiditet*

Alle dyr observeres nøje mindst en gang dagligt med hensyn til deres almindelige helbredstilstand og to gange dagligt for morbiditet og mortalitet.

1.6.1.2. *Detaljerede kliniske observationer*

Der foretages detaljerede kliniske observationer af alle dyr, som er udvalgt til dette formål (se tabel 1) én gang inden første eksponering (for at sammenligne gentagne observationer af samme individ) og derefter med forskellige intervaller, alt efter undersøgelsens varighed (se tabel 2). Ved restitutionsperiodens slutning foretages detaljerede kliniske observationer af satellit-restitutionsgrupperne. Detaljerede kliniske observationer finder sted uden for opholdsburet på en »open field«. Observationerne registreres nøje med brug af bedømmelsessystemer, der omfatter kriterier eller bedømmelsesskalaer for hver af de til observationerne hørende målinger. De anvendte kriterier eller skalaer skal være tydeligt fastlagt af testlaboratoriet. Der skal drages omsorg for at sikre, at variationerne i forsøgsbetingelserne er mindst mulige (ikke systematisk behandlingsrelaterede) og at observationerne foretages af faguddannede observatører, som er uden viden om den pågældende behandling.

Det anbefales, at observationerne udføres på struktureret måde, således at veldefinerede kriterier (herunder definition af »normalområdet«) systematisk finder anvendelse på hvert dyr på hvert observationstidspunkt. »Normalområdet« skal være veldokumenteret. Alle observerede tegn skal registreres. Også størrelsesordenen af de observerede tegn registreres, når det er muligt. De kliniske observationer skal omfatte, men er ikke begrænset til, ændringer i hud, skin, øjne, slimhinder, optræden af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, pilorektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster og/eller mundrespiration, eventuelle symptomer vedrørende vandladning eller defækation, samt farveforandringer af urinen).

▼B

Eventuel usædvanlig respons med hensyn til kropsstilling, aktivitetsniveau (f.eks nedsat eller øget udforskning af »open field«) og koordinering af bevægelser registreres ligeledes. Ændringer i gangen (f.eks vralten, ataksi), stilling (f.eks. pukkelrygget) og reaktion på håndtering samt optræden af kloniske eller toniske bevægelser, kramper eller tremor, stereotypier (f.eks. overdreven pleje af pels, usædvanlige bevægelser af hovedet, gentagne cirkelbevægelser) eller bizar adfærd (bidning eller overdreven slikning, selvmutilering, baglæns gang, vokalisation) eller aggression protokolleres.

1.6.1.3. *Funktionsprøver*

I lighed med de detaljerede kliniske observationer skal funktionsprøver udføres én gang før eksponering og derefter hyppigt for alle dyr, der er udvalgt til dette formål (se tabel 1). Hyppigheden af funktionsprøverne fastsættes ligeledes i henhold til undersøgelsens varighed (se tabel 2). Ud over de i tabel 2 angivne observationsperioder foretages observation af satellit-restitutionsgrupper så tæt som muligt på tidspunktet for den afsluttende aflivning. Funktionsprøverne skal omfatte sensorisk reaktionsformåen på forskellige stimuli (f.eks auditive, visuelle og proprioceptive (5)(6)(7)), bedømmelse af lemmernes gribestyrke (8) samt bedømmelse af motorisk aktivitet (9). Den motoriske aktivitet måles med en automatiseret anordning, som kan registrere både fald og stigning i aktivitet. Anvendes et andet system, skal dette være kvantitativt, og dets følsomhed og pålidelighed skal være godtgjort. Hver anordning skal afprøves for at sikre varig pålidelighed af og overensstemmelse mellem anordningerne. Nærmere detaljer om de fremgangsmåder, der kan benyttes, er givet i de pågældende litteraturhenvisninger. Hvis der ikke er data, som peger på potentielle neurotoksiske virkninger (f.eks. vedrørende struktur-aktivitet, epidemiologiske data, andre toksikologiundersøgelser), må man overveje mere specialiserede test af sensoriske og motoriske funktioner eller indlæring og hukommelse for at undersøge disse mulige virkninger i nærmere detaljer. Nærmere oplysninger om specialiserede test og deres anvendelse er givet i (1).

Undtagelsesvis kan man i den pågældende test udelade dyr, som viser tegn på toksicitet af et omfang, som vil forstyrre funktionstesten væsentligt. Elimination af dyr fra en funktionstest skal begrundes.

1.6.2. **Kropsvægt og foder-/vandindtagelse**

I undersøgelser af indtil 90 dages varighed skal alle dyr vejes mindst én gang om ugen, og ligeledes mindst én gang om ugen måles foderindtagelsen (vandindtagelsen, når teststoffet administreres i vandet). I langtidsundersøgelser vejes alle dyr mindst én gang om ugen i de første 13 uger, derefter mindst én gang hver fjerde uge. Foderindtagelsen (vandindtagelsen, når teststoffet indgives i vandet) måles mindst én gang om ugen de første 13 uger, derefter ca. hver tredje måned, medmindre dyrenes sundhedstilstand eller ændringer i kropsvægt tilsiger noget andet.

▼B

1.6.3. **Oftalmologi**

I undersøgelser af længere varighed end 28 dage foretages oftalmologisk undersøgelse med oftalmoskop eller tilsvarende egnet instrument inden indgift af teststoffet og ved undersøgelsens slutning, helst på alle dyr, men i det mindste på dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Hvis der findes øjenforandringer eller de kliniske symptomer viser, at der er behov derfor, skal alle dyr undersøges. I langtidsundersøgelser skal der endvidere foretages en oftalmologisk undersøgelse ved 13 uger. Oftalmologisk undersøgelse behøver ikke udføres, når sådanne data allerede foreligger fra andre undersøgelser med tilsvarende varighed og dosisniveau.

1.6.4. **Hæmatologiske og klinisk-biokemiske prøver**

Når neurotoksicitetsundersøgelsen udføres i kombination med en systemisk toksicitetsundersøgelse med gentagen dosering, foretages hæmatologisk undersøgelse og klinisk-biokemiske bestemmelser som angivet i den pågældende metode til systemiske toksicitetsforsøg. Prøvetagning skal ske således, at en eventuel påvirkning af neuroadfærd bliver mindst mulig.

1.6.5. **Histopatologi**

Den neuropatologiske undersøgelse skal være udformet, så den supplerer og udvider de observationer, der er gjort i undersøgelsens in vivo-fase. Væv fra mindst fem dyr/køn/gruppe (se tabel 1 og næste afsnit) fikseres in situ med almindeligt anerkendte perfusions- og fiksationsteknikker (se henvisning (3), kapitel 5, og henvisning (4), kapitel 50). Alle makroskopiske forandringer protokolleres. Når undersøgelsen udføres som enkeltstående screening for neurotoksicitet eller til karakterisering af neurotoksiske virkninger, kan de resterende dyr enten bruges til specifikke neuroadfærdsmæssige (10)-(11), neuropatologiske (10)(11)(12)(13), neurokemiske (10)(11)(14)-(15) eller elektrofysiologiske (10)(11)(16)(17) procedurer, som kan supplere de her beskrevne procedurer og undersøgelser, eller til at øge det antal dyr, som undersøges histopatologisk. Sådanne supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer eller forventede virkninger peger på neurotoksicitet af specifik art eller med specifikt målorgan (2)(3). Alternativt kan de resterende dyr også bruges til rutinemæssig patologisk bedømmelse som beskrevet i metoden til undersøgelser med gentagen dosering.

Alle paraffinindstøbte vævsprøver farves med en all-round farvemetode som hematoxylin-eosin og undersøges mikroskopisk. Hvis der observeres eller formodes at være tegn på perifer neuropati. skal plastindstøbte prøver af perifert nervevæv undersøges. Kliniske symptomer kan også give anledning til, at der vælges supplerende prøvetagningssteder eller benyttes specialfarvning. Vejledning om supplerende prøvetagningssteder kan findes i (3)(4). Passende specialfarvning til påvisning af bestemte typer patologiske forandringer kan ligeledes være nyttig (18).

▼B

Repræsentative snit af centralnervesystem og det perifere nervesystem undersøges histologisk (se henvisning (3), kapitel 5 og henvisning (4), kapitel 50). De undersøgte områder skal normalt omfatte forhjerne, den centrale del af cerebrum, herunder et snit gennem hippocampus, midterhjernen, cerebellum, pons, medulla oblongata, øjet med nervus opticus og retina, rygmarven med intumescentia cervicalis og lumbalis, de dorsale rodganglier, fibre fra de dorsale og ventrale rødder, den proksimale del af nervus sciaticus, den proksimale del af nervus tibialis (ved knæene) og lægmuskelgrenene af nervus tibialis. Der skal være både tværsnit og længdesnit af rygmarv og perifere nerver. Man skal være opmærksom på nervesystemets kar. En prøve af skeletmuskel, helst lægmusklen, skal ligeledes undersøges. Især skal man være opmærksom på celle- og fiberstruktur i de dele af centralnervesystem og det perifere nervesystem, der særligt påvirkes af neurotoksiske stoffer.

Vejledning i de neuropatologiske forandringer, der typisk resulterer af toksisk påvirkning, findes i henvisning (3)(4). Trinvis undersøgelse af vævsprøverne anbefales, således at snittene fra højdosisgrupperne først sammenlignes med dem fra kontrolgrupperne. Ses ingen neuropatologiske forandringer i prøverne fra disse grupper, er efterfølgende analyse unødvendig. Er der neuropatologiske forandringer i højdosisgruppen, skal prøver fra hvert af de potentielt berørte væv fra mellem- og lavdosisgrupperne kodes og undersøges sekventielt.

Findes der ved den kvalitative undersøgelse tegn på neuropatologiske forandringer, udføres endnu en undersøgelse af alle de dele af nervesystemet, som udviser sådanne forandringer. Snit fra alle dosisgrupper fra hver af de potentielt berørte regioner kodes og undersøges vilkårligt uden kendskab til koden. For hver forandring registreres dens frekvens og sværhed. Når alle regioner fra alle dosisgrupper er blevet bedømt, kan koden brydes og statistisk analyse foretages til bedømmelse af dosis-respons-forholdet. For hver forandring skal der gives eksempler på beskrivelse af forskellige sværhedsgrader.

De neuropatologiske fund bedømmes i sammenhæng med de adfærdsmæssige observationer og målinger samt øvrige data fra forudgående og sideløbende toksicitetsundersøgelser af teststoffet.

## 2. DATA

### 2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Der skal forefindes data for de enkelte dyr. Derudover sammenfattes alle data i tabelform med angivelse, for hver forsøgs- og kontrolgruppe, af antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, tidspunkt for eventuel død eller humanitær aflivning, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, beskrivelse af de observerede toksicitetstegn, herunder begyndelsestidspunkt, varighed, art og sværhed af alle toksiske virkninger, antal dyr, som udviser forandringer, herunder forandringernes art og sværhed.

▼B

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Undersøgelsens fund bedømmes med hensyn til forekomst, sværhed og korrelation mellem neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske virkninger (foruden neurokemiske og elektrofysiologiske virkninger, når supplerende undersøgelser indgår) samt eventuelle andre observerede negative virkninger. Når det er muligt, bedømmes resultaterne ved en egnet og almindeligt anerkendt statistisk metode. Valg af statistisk metode skal finde sted i forbindelse med fastlæggelsen af undersøgelsens design.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

For teststoffet:

— fysisk beskaffenhed (herunder isomeri, renhed og fysisk-kemisk egenskaber)

— identifikationsdata.

For eventuelt vehikel:

— begrundelse for valg af vehikel.

For forsøgsdyrene:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, opstaldning, foder, osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse.

For forsøgsbetingelserne:

— oplysninger om formuleringen af teststof/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

— specifikation af de indgivne doser, herunder enkeltheder vedrørende vehiklet, volumen og fysisk tilstand af det indgivne materiale

— oplysninger om administration af teststoffet

— begrundelse for de valgte dosisniveauer

— begrundelse for administrationsvej og eksponeringens varighed

— i givet fald, omregning fra teststofkoncentration i foder/drikkevand (ppm) til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/døgn)

— enkeltheder vedrørende foderets og vandets kvalitet.

For observationer og testprocedurer:

— enkeltheder vedrørende tilordningen af dyrene i hver gruppe til perfusionsundergrupper

— enkeltheder vedrørende bedømmelsessystemet, herunder kriterier og bedømmelsesskalaer for hver i de til de detaljerede kliniske observationer hørende målinger

▼B

— detaljeret beskrivelse af funktionstest af sensorisk reaktionsformåen på forskellige stimuli (f.eks. auditive, visuelle og proprioceptive), til bedømmelse af lemmernes gribestyrke, til vurdering af motorisk aktivitet (herunder enkeltheder vedrørende automatiserede anordninger til detektion af aktivitet) samt eventuelle andre procedurer, som anvendes

— detaljeret beskrivelse af oftalmologiske undersøgelser og, i givet fald, hæmatologiske og klinisk biokemiske undersøgelser med relevante normalværdier

— detaljeret beskrivelse af de enkelt neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske, neurokemiske og elektrofysiologiske procedurer.

Resultater:

— kropsvægt/kropsvægtændringer, herunder kropsvægt ved aflivning

— fødeindtagelse og vandindtagelse, når det er relevant

— data vedrørende toksisk respons for hvert køn og dosisniveau, herunder toksicitetstegn og dødelighed

— art, sværhedsgrad og varighed (indsætten og efterfølgende forløb) af detaljerede kliniske observationer (hvad enten disse er reversible eller ikke)

— detaljeret beskrivelse af resultaterne af alle funktionstest

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af resultaterne af alle neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske og neurokemiske eller elektrofysiologiske fund, hvis de foreligger

— data vedrørende absorption og metabolisme, hvis de foreligger

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne

Diskussion af resultaterne:

— oplysninger vedrørende dosis-respons-forhold

— eventuelle andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende teststoffets neurotoksiske potentiale

— angivelse af NOAEL

Konklusioner:

— det anbefales, at der afgives en konkret erklæring om den samlede neurotoksicitet af teststoffet.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD Giudance Document on Neorutoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guidline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds, Williams and Wilkins, Battimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980), Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691-704.

(7) Moser, V.C., McDaniel. K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic, Appl, Pharmacol., 108, 267-283.

(8) 8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(9) 9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343-352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, pp. 726-742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

*Tabel 1*

**Mindste antal dyr pr. gruppe, når neuroloksicitetsundersøgelsen udføres separat eller i kombination med andre undersøgelser**

| | Neurotoksicitetsundersøgelse udført som: | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Separat undersøgelse | Kombineret med 28-dages forsøg | Kombineret med 90-dages forsøg | Kombineret med det kroniske toksicitetsforsøg |
| Samlet antal dyr pr. gruppe | 10 hanner og 10 hunner | 10 hanner og 10 hunner | 15 hanner og 15 hunner | 25 hanner og 25 hunner |
| Antal dyr udvalgt til funktionstestning, herunder detaljerede kliniske observationer | 10 hanner og 10 hunner | 10 hanner og 10 hunner | 10 hanner og 10 hunner | 10 hanner og 10 hunner |
| Antal dyr udvalgt til perfusion in situ og neurohistopatologisk undersøgelse | 5 hanner og 5 hunner | 5 hanner og 5 hunner | 5 hanner og 5 hunner | 5 hanner og 5 hunner |
| Antal dyr udvalgt til observation af toksicitet ved gentagen dosering/subkronisk/kronisk forsøg, hæmatologisk undersøgelse, klinisk-biokemisk undersøgelse, histopatologisk undersøgelse osv. som angivet i de respektive *Guidelines* | | 5 hanner og 5 hunner | 10 hanner ([1]) og 10 hunner ([1]) | 20 hanner ([1]) og 20 hunner ([1]) |
| Eventuelle supplerende observationer | 5 hanner og 5 hunner | | | |

([1]) Heri indgår fem dyr, som er udvalgt til funktionstestning og detaljerede kliniske observationer som led i neurotoksicitetsundersøgelsen.

▼B

*Tabel 2*

**Hyppighed af kliniske observationer og funktionstest**

| Type observationer | | Undersøgelsens varighed | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Akut | 28-dages | 90-dages | Kronisk |
| I alle dyr | Generel sundhedstilstand | dagligt | dagligt | dagligt | dagligt |
| | Mortalitet/morbiditet | To gange dagligt | To gange dagligt | To gange dagligt | To gange dagligt |
| I dyr, som er udvalgt til observation af funktioner | Detaljerede kliniske observationer | — inden første eksponering<br>— senest 8 timer efter dosering ved det skønnede tidspunkt for maksimal effekt<br>— på dag 7 og 14 efter dosering | — inden første eksponering<br>— derefter en gang om ugen | — inden første eksponering<br>— én gang under den første eller anden uges eksponering<br>— derefter en gang om måneden | — inden første eksponering<br>— én gang efter den første måneds eksponering<br>— derefter hver tredje måned |
| | Funktionsprøver | — inden første eksponering<br>— senest 8 timer efter dosering det skønnede tidspunkt for maksimal effekt<br>— på dag 7 og 14 efter dosering | — inden første eksponering<br>— under den fjerde uges behandling så nær eksponeringsperiodens slutning som muligt | — inden første eksponering<br>— én gang under den første eller anden uges eksponering<br>— derefter en gang om måneden | — inden første eksponering<br>— én gang efter den første måneds eksponering<br>— derefter hver tredje måned |

▼B

B.44. **HUDABSORPTION: IN VIVO-METODE**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 427 (2004).

1.1. INDLEDNING

Skønt det for mange kemiske stoffers vedkommende hovedsagelig er gennem huden, at eksponering forekommer, anvendes der oral indgift i de fleste toksikologiske undersøgelser i forsøgsdyr. I denne guideline beskrives en in vivo-undersøgelsesmetode for perkutan absorption, der danner det bindeled, man behøver for at ekstrapolere fra orale undersøgelser og foretage en sikkerhedsvurdering efter eksponering af huden.

For at få adgang til kredsløbet må et stof trænge gennem mange cellelag i huden. For de fleste stoffers vedkommende er det hastighedsbestemmende lag stratum corneum, der består af døde celler. Hudens permeabilitet afhænger dels af det kemiske stofs lipofile egenskaber, dels af tykkelsen af det yderste lag af epidermis, og dels faktorer som stoffets molekylvægt og koncentration. Hud fra rotter og kaniner er sædvanligvis mere permeabel end hud fra mennesker, mens permeabiliteten af hud fra marsvin og aber bedre svarer til menneskets.

Metoder til måling af perkutan absorption kan inddeles i to kategorier: in vivo og in vitro. In vivo-metoderne er gode til at give oplysninger om hudabsorptionen i forskellige laboratoriedyrearter. I den senere tid er der udviklet in vitro-metoder. Med dem undersøges transporten gennem dyre- eller menneskehud i hel eller partiel tykkelse til et væskereservoir. In vitro-metoden er beskrevet i en særskilt testmetode (1). Med henblik på valg af den bedst egnede metode under de givne betingelser anbefales det at støtte sig til OECD's Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2), der nærmere beskriver in vivo- og in vitro-metodernes anvendelighed.

Med den her beskrevne in vivo-metode kan prøvestoffets penetration gennem huden til det systemiske rum bestemmes. Teknikken har fundet udbredt anvendelse i en længere årrække (3)(4)(5)(6)(7). Skønt in vitro-undersøgelser af perkutan absorption i mange tilfælde kan være hensigtsmæssige, kan der forekomme situationer, hvor kun et in vivo-forsøg giver de nødvendige oplysninger.

Fordelene ved in vivo-metoden er, at der anvendes et fysiologisk og metabolisk intakt system, at dyrearten er den samme som i mange toksicitetsundersøgelser, og at metoden kan tilpasses andre dyrearter. Ulemperne er, at der anvendes levende dyr, at der må bruges radioaktivt mærket stof for lettere at skaffe pålidelige resultater, at den tidlige absorptionsfase er vanskelig at bestemme, og at permeabiliteten af hud fra den foretrukne art (rotte) afviger fra den menneskelige huds. Hud fra dyr er sædvanligvis lettere permeabel, hvilket kan medføre overvurdering af den perkutane absorption i mennesker (6)(8)(9). Ætsende stoffer bør ikke testes i levende dyr.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Uabsorberet dosis**: den del af dosis, der vaskes af hudoverfladen efter eksponering, og den, der findes på den ikke lukkede afdækning, samt den del, der påvises at forflygtiges fra huden under eksponeringen.

**Absorberet dosis (in vivo)**: den del af dosis, der er til stede i urin, vaskevand fra bure, fæces, udåndingsluft (hvis den måles), blod, væv (hvis dette opsamles) og resten af kadaveret efter fjernelse af huden fra påføringsstedet.

**Absorberbar dosis**, den del af dosis, der er til stede på eller i huden efter afvaskning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet, helst radioaktivt mærket, påføres den glatragede hud på dyrene i en eller flere passende doseringer i form af en repræsentativ, ibrugværende formulering. Testpræparatet efterlades i kontakt med huden i et fast tidsrum under en passende afdækning (ikke tillukket, delvis tillukket eller helt tillukket), der forhindrer, at dyret indtager testpræparatet. Når eksponeringstiden er gået, fjernes afdækningen, huden renses med passende rengøringsmiddel, afdækning og rengøringsmaterialer opbevares til analyse, og der anlægges en ny afdækning. Før, under og efter eksponeringsperioden holdes dyrene i individuelle metabolismebure, og ekskreter og udåndingsluft fra de pågældende perioder opsamles til analyse. Opsamling af udåndingsluft kan undlades, når der foreligger fyldestgørende oplysninger om, at der slet ikke eller kun i ringe omfang dannes radioaktive metabolitter. Normalt er der i hver undersøgelse flere grupper dyr, der eksponeres for testpræparatet. Én gruppe aflives ved udløb af eksponeringsperioden. De øvrige grupper aflives efterfølgende efter en fast tidsplan (2). Ved udløb af prøvetagningsperioden aflives de resterende dyr, blod opsamles til analyse, påføringsstedet fjernes til analyse, og kadaveret analyseres for eventuelt ikke udskilt stof. Prøvernes indhold bestemmes med egnede metoder, og graden af perkutan absorption beregnes (6)(8)(9).

1.4. BESKRIVELSE AF METODEN

1.4.1. **Valg af dyreart**

Den mest anvendte art er rotten, men der kan også anvendes ubehårede stammer eller arter med en hudabsorptionsrate bedre svarende til menneskets (3)(6)(7)(8)(9). Der benyttes unge voksne, raske dyr af samme køn (handyr er standardvalget) af sædvanligt anvendte laboratoriestammer. Ved testens begyndelse må intet dyr afvige mere end ± 20 % fra gennemsnitsvægten. Som eksempel på egnede dyr kan nævnes hanrotter på 200 g–250 g, navnlig i øverste halvdel af dette område.

▼B

1.4.2. **Dyrenes antal og køn**

Der skal være en gruppe på mindst fire dyr af samme køn for hvert testpræparat og hvert planlagt sluttidspunkt. Hver gruppe dyr aflives efter forskellige tidsrum, f.eks. ved afslutningen af eksponeringsperioden (typisk 6 eller 24 timer) og efterfølgende (f.eks. 48 og 72 timer). Er der påvist væsentlig forskel i hudtoksicitet mellem hanner og hunner, vælges det følsomste køn. I modsat fald vælges enten det ene eller det andet køn.

1.4.3. **Miljøbetingelser og fodring**

Temperaturen i forsøgslokalet skal være 22 ºC (± 3 ºC). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Der anvendes sædvanligt laboratoriefoder og fri adgang til drikkevand. Under forsøget, og helst også under akklimatiseringen, skal dyrene være anbragt enkeltvis i metabolismebure. Risikoen for spild af foder og vand skal nedsættes til det mindst mulige, da man ellers vil få upålidelige resultater.

1.4.4. **Forberedelse af dyrene**

Dyrene mærkes, så de kan identificeres enkeltvis, og holdes i burene i mindst fem døgn forud for forsøgets begyndelse, for at de kan akklimatisere sig til laboratorieomgivelserne.

Efter akklimatiseringsperioden og ca. 24 timer inden dosering glatrages et hudområde omkring skuldre og ryg på hvert dyr. Dette skal ske forsigtigt, så skrabning af huden undgås, da beskadiget hud har andre permeabilitetsegenskaber end intakt hud. Efter glatragning og ca. 24 timer før påføring af prøvestoffet på huden (se punkt 1.4.7) aftørres huden med acetone for at fjerne talg. Supplerende vask med sæbe og vand frarådes, da eventuelle sæberester kan fremme absorptionen af teststoffet. Arealet skal have en størrelse, der muliggør en pålidelig beregning af den absorberede mængde teststof pr. $cm^2$ hud, helst mindst 10 $cm^2$. Denne arealstørrelse er praktisk mulig på rotter med kropsvægt 200-250 g. Efter forberedelse sættes dyrene tilbage i metabolismeburene.

1.4.5. **Teststof**

Teststoffet er den enhed, hvis penetrationsegenskaber skal undersøges. Ideelt bør teststoffet være radioaktivt mærket.

1.4.6. **Testpræparat**

Testpræparatet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Enhver afvigelse fra det »ibrugværende« præparat skal begrundes. Om nødvendigt opløses eller opslæmmes teststoffet i et egnet bærestof. For andre bærestoffer end vand skal dets absorptionsegenskaber og potentielle vekselvirkning med teststoffet være kendt.

▼B

1.4.7. **Påføring på huden**

Et påføringssted med et nærmere bestemt overfladeareal afgrænses på hudoverfladen. En kendt mængde testpræparat fordeles derefter jævnt på stedet. Sædvanligvis anvendes en mængde svarende til den potentielle eksponering af mennesker, typisk 1-5 mg/cm$^2$ for faste stoffer og indtil 10 µl/cm$^2$ for væsker. Eventuelle andre mængder skal begrundes i de forventede anvendelsesbetingelser, forsøgets målsætning eller testpræparatets fysiske egenskaber. Efter påføring beskyttes det behandlede område mod vartning. Figur 1 viser et eksempel på en typisk anordning. Sædvanligvis tildækkes påføringsstedet med en ikke lukket afdækning (f.eks. permeabel nylongaze). Ved påføring af ubegrænsede doser bør påføringsstedet dog være tillukket. Når genfindingen af et halvflygtigt på grund af fordampning mindskes uacceptabelt (se også punkt 1.4.10, første afsnit), skal det fordampede stof opfanges i et aktivt kulfilter, der dækker påføringsanordningen (se figur 1). Det er vigtigt at eventuelle sådanne anordninger ikke beskadiger huden, absorberer testpræparatet eller reagerer med dette. Dyrene sættes tilbage i hvert sit metabolismebur med henblik på opsamling af ekskreter.

1.4.8. **Varighed af eksponering og prøvetagning**

Eksponeringens varighed er tidsrummet mellem påføring af testpræparatet og fjernelse af dette ved afvaskning af huden. Der vælges en eksponeringsperiode (typisk 6 eller 24 timer), som er relevant i forhold til forventede eksponeringsvarighed for mennesker. Efter eksponeringsperioden holdes dyrene i metabolismeburene indtil den planmæssige afslutning. Dyrene observeres for tegn på toksicitet/unormale reaktioner med regelmæssige mellemrum under hele forsøget. Ved afslutningen af eksponeringsperioden observeres den behandlede hud for synlige tegn på irritation.

Metabolismeburene skal muliggøre separat opsamling af urin og fæces under hele undersøgelsen. Desuden skal de muliggøre opsamling af $^{14}$C-carbondioxid og flygtige $^{14}$C-carbonforbindelser, som analyseres hvis de dannes i en mængde af over 5 %. Urin, fæces og udskilte væsker (f.eks. $^{14}$C-carbondioxid og flygtige C-forbindelser) opsamles individuelt fra hver gruppe på hvert prøvetagningstidspunkt. Åbne bure kan anvendes, hvis det er tilstrækkeligt dokumenteret, at der kun i ringe omfang eller slet ikke dannes radioaktive metabolitter.

Ekskreter opsamles i eksponeringsperioden indtil 24 timer efter den indledende hudkontakt og derefter dagligt til forsøgets slutning. Normalt vil tre opsamlingstidspunkter for ekskreter være tilstrækkeligt, men testpræparatets påtænkte formål eller foreliggende kinetiske data kan tilsige, at andre tidspunkter vil være mere hensigtsmæssige, eller at de må suppleres.

Ved eksponeringsperiodens slutning aftages beskyttelsesanordningen fra hvert dyr og opbevares separat med henblik på analyse. Den behandlede hud fra alle dyr vaskes mindst tre gange med rengøringsmiddel og passende servietter. Der skal vises omhu for at undgå kontaminering af andre dele af kroppen. Rengøringsmidlet skal være repræsentativt for sædvanlig hygiejnepraksis, f.eks. sæbevand. Endelig skal huden tørres. Alle servietter og alt vaskevand opbevares med henblik på analyse. På dyr i grupperne svarende til efterfølgende tidspunkter anlægges en frisk afdækning til at beskytte det behandlede sted, hvorefter dyrene sættes tilbage i hvert sit bur.

▼B

1.4.9. **Afsluttende procedurer**

For hver gruppe aflives de enkelte dyr på det fastsatte tidspunkt, og blod opsamles til analyse. Beskyttelsesanordning eller afdækning fjernes med henblik på analyse. Huden fra påføringsstedet og et tilsvarende areal af ikke-doseret, glatraget hud fjernes fra hvert dyr til separat analyse. For at skaffe flere oplysninger om teststoffets fordeling kan påføringsstedet spaltes, så stratum corneum adskilles fra det underliggende epidermis. Fastlæggelse af denne fordelings tidsmæssige forløb efter eksponeringsperioden vil give et fingerpeg om teststoffets skæbne i stratum corneum. For at lette spaltningen af huden (efter den endelige hudvask og aflivning af dyret) fjernes hver afdækning. Huden fra påføringsstedet eksciseres fra rotten sammen med det ringformede parti af omgivende hud og hæftes op på en plade. Et stykke tape lægges på hudoverfladen med et let tryk, og tapen fjernes sammen med en del af stratum corneum. Der fortsættes med flere tapestykker, indtil tapen ikke længere hænger fast i hudoverfladen, når hele stratum corneum er fjernet. Alle tapestykker fra hvert dyr kan lægges i en enkelt beholder, som derefter tilsættes et vævsopløsende middel for at opløse stratum corneum. Alle potentielle målvæv kan fjernes med henblik på separat bestemmelse, før resten af kadaveret analyseres for absorberet dosis. Kadaveret af hvert enkelt dyr opbevares til analyse. Sædvanligvis vil analyse af det totale indhold være tilstrækkelig. Målorganer kan udtages til separat analyse (hvis det tilsiges af andre undersøgelser). Blærens indhold af urin på det planmæssige aflivningstidspunkt hældes sammen med den foregående urinopsamling. Efter at ekskreterne fra metabolismeburene på det planmæssige aflivningstidspunkt er opsamlet, vaskes burene og deres opsamlingsanordning med et passende opløsningsmiddel. Andet potentielt kontamineret udstyr analyseres ligeledes.

1.4.10. **Analyse**

I alle undersøgelser skal opnås tilstrækkelig genfinding (dvs. gennemsnitligt 100 ± 10 % af radioaktiviteten). Er genfindingen uden for dette område, skal det begrundes. Den tilførte mængde dosis i hver prøve bestemmes med behørigt validerede metoder.

I de statistiske overvejelser skal indgå et mål for variansen mellem gentagelserne for hver påføring.

2. **DATA**

Følgende målinger foretages for hvert dyr på hvert prøvetagningstidspunkt af teststoffet og/eller dets metabolitter. Foruden individuelle data angives gennemsnitsværdier for hvert prøvetagningstidspunkt.

— den mængde, der er knyttet til beskyttelsesanordningerne

— den mængde der kan fjernes fra huden

— den mængde i eller på huden, der ikke kan vaskes af huden

▼B

— mængde i de udtagne blodprøver

— mængde i ekskreter og udåndingsluft (hvis relevant)

— resterende mængde i kadaveret og eventuelle organer, der er udtaget til separat analyse.

Ud fra mængden af teststof og/eller metabolitter i ekskreter, udåndingsluft, blod og kadaver kan den totale absorberede mængde på hvert tidspunkt bestemmes. Desuden kan man beregne mængde teststof absorberet pr. $cm^2$ hud, der er eksponeret for teststoffet i eksponeringsperioden.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal dække de krav, der er fastsat i protokollen, herunder en begrundelse for det anvendte testsystem, og skal omfatte følgende:

Teststof:

— identifikationsdata (f.eks. CAS-nummer, hvis det foreligger, oprindelse, renhed (radiokemisk renhed), kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk form, fysiske-kemiske egenskaber (f.eks. pH, flygtighed, opløselighed, stabilitet, molekylvægt og log $P_{ow}$).

Testpræparat:

— formulering og begrundelse for dens anvendelse

— nærmere oplysninger om testpræparatet: anvendt mængde, opnået koncentration, bærestof, stabilitet og homogenitet.

Forsøgsdyr:

— den anvendte art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

— de enkelte dyrs vægt ved forsøgets begyndelse og slutning.

Forsøgsbetingelser:

— nærmere oplysninger om administration af testpræparatet (påføringssted, assaymetoder, tillukket/ikke tillukket, volumen, ekstraktion, påvisning)

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet.

Resultater:

— eventuelle tegn på toksicitet

— absorptionsdata i tabelform (udtrykt som hastighed, mængde eller procentdel)

▼B

— totale genfindingsværdier i forsøget

— fortolkning af resultater, sammenholdelse med eventuelle foreliggende oplysninger om perkutan absorption af teststoffet.

Diskussion af resultater

Konklusioner

4. **HENVISNINGER**

(1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5), 829-835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

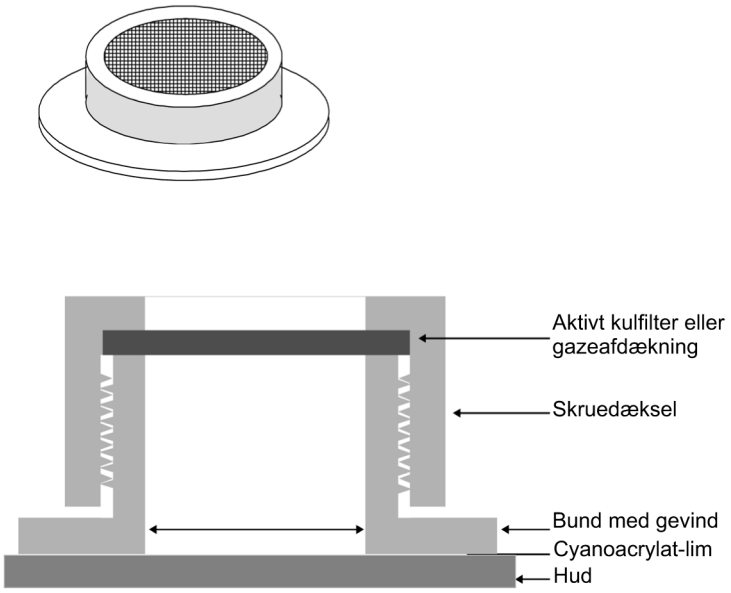
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, 369-373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54, 399-404.

▼B

*Figur 1*

**Eksempel på typisk anordning til afgrænsning og beskyttelse af påføringsstedet på huden ved in vivo-undersøgelser af perkutan absorption**



▼B

B.45. **HUDABSORPTION: IN VITRO-METODE**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 428 (2004).

1.1. INDLEDNING

Metodens formål er undersøgelse af teststoffers absorption ved påføring af disse på eksciseret hud. Den kan enten kombineres med metoden til hudabsorption in vivo (1) eller anvendes separat. Vedrørende udformningen af undersøgelser baseret på denne testmetode anbefales det at konsultere OECD's vejledning »Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies« (2). OECD's vejledning er udarbejdet for at lette valget af egnede in vitro-metoder til anvendelse under nærmere bestemte omstændigheder og derigennem sikre pålideligheden af de resultater, der fås ved brug af metoden.

Metoder til måling af hudabsorption og afgivelse til huden kan inddeles i to kategorier: in vivo og in vitro. In vivo-metoder til hudabsorptionsundersøgelser er veletablerede og giver farmakokinetiske oplysninger i en række dyrearter. En in vivo-metode er beskrevet særskilt i en anden testmetode (1). Også in vitro-metoder er i mange år blevet anvendt til måling af hudabsorption. Skønt der ikke er udført formelle valideringsundersøgelser af de in vitro-metoder, der er omfattet af denne testmetode, var OECD-eksperter i 1999 enige om, at in vitro-metoden (3) var tilstrækkeligt underbygget med evaluerede data. I vejledningen (2) underbygges metoden yderligere, bl.a. med et betydeligt antal direkte sammenligninger af in vitro- og in vivo-metoder. Emnet er gennemgået i en række monografier, hvor der detaljeret redegøres for baggrunden for anvendelse af en in vitro-metode (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Med in vitro-metoder måles diffusionen af kemiske stoffer ind i og tværs gennem hud til en væskebeholder, idet der enten kan bruges ikke-levende hud og således alene måles diffusion, eller frisk, metabolisk aktiv hud til måling af både diffusion og hudmetabolisme. Sådanne metoder har især fundet anvendelse til screening af kemiske stoffers indtrængen i og optagelse gennem hud fra forskellige formuleringer og kan desuden være nyttige som modeller ved vurdering af perkutan absorption i mennesker.

In vitro-metoden er ikke nødvendigvis anvendelig på alle situationer eller på alle klasser af kemiske stoffer. In vitro-metoden kan være brugbar til indledende kvalitativ evaluering af hudpenetration. I visse tilfælde kan det være nødvendigt efterfølgende at supplere med in vivo-data. Med henblik på nærmere fastlæggelse af situationer, hvor in vitro-metoden vil være egnet, henvises til vejledningen (2). Mere detaljerede oplysninger til støtte for denne afgørelse findes i (3).

I beskrivelsen af denne metode redegøres for generelle principper for måling af teststoffers absorption af og afgivelse til eksciseret hud. Der kan anvendes hud fra mange pattedyrarter, herunder mennesker. Hudens permeabilitetsegenskaber bevares efter ekscision fra kroppen, da den vigtigste diffusionsbarriere er det ikke-levende stratum corneum; der ikke er fundet aktiv transport af kemiske stoffer gennem huden. Skønt huden er påvist at kunne metabolisere visse kemiske stoffer under perkutan absorption (6), er processen er ikke hastighedsbegrænsende for den faktisk absorberede dosis, selv om den kan påvirke arten af de stoffer, der træder ind i blodet.

▼B

1.2. DEFINITIONER

**Uabsorberet dosis:** den del af dosis, der vaskes af hudoverfladen efter eksponering, og den, der findes på den ikke lukkede afdækning, samt den del, der påvises at forflygtiges fra huden under eksponeringen.

**Absorberet dosis (in vitro):** massen af teststof, der tilføres receptorvæsken eller det systemiske kredsløb inden for et nærmere fastlagt tidsrum.

**Absorberbar dosis (in vitro):** den del af dosis, der er til stede på eller i huden efter afvaskning.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Teststoffet, som kan være radioaktivt mærket, påføres på overfladen af en hudprøve, der danner adskillelse mellem de to kamre i en diffusionscelle. Stoffet efterlades på huden i et fastlagt tidsrum under nærmere angivne betingelser, hvorefter det fjernes med en passende rensningsmetode. Der udtages prøver af receptorvæsken på tidspunkter fordelt over hele forsøget, og prøverne analyseres for teststoffet og/eller dets metabolitter.

Anvendes metabolisk aktive systemer, kan teststoffets metabolitter analyseres med egnede metoder. Ved forsøgets slutning bestemmes den kvantitative fordeling af teststoffet og dets metabolitter, når det er relevant.

Under passende betingelser, der er beskrevet i denne metode og i vejledningen (2), måles teststoffets absorption i løbet af et givet tidsrum ved analyse af receptorvæsken og den behandlede hud. Teststof, der er tilbageblevet i huden, anses for absorberet, medmindre det kan vises at absorptionen kan bestemmes alene ud fra værdier for receptorvæsken. Efter analyse af de øvrige komponenter (materiale vasket af huden og materiale tilbageholdt i hudlagene) kan der foretages en nærmere vurdering af data, herunder teststoffets totale fordeling og genfindingsprocent.

For at godtgøre testsystemets ydeevne og pålidelighed, således som det anvendes i det pågældende laboratorium, skal der for relevante referencestoffer foreligge resultater, som udviser overensstemmelse med offentliggjort litteratur om den anvendte metode. Dette krav kan tænkes opfyldt ved test af et passende referencestof (fortrinsvis med lipofile egenskaber, der ligner teststoffets) sideløbende med teststoffet eller ved fremlæggelse af fyldestgørende historiske data for en række referencestoffer med forskellige lipofile egenskaber (f.eks. koffein, benzoesyre og testosteron).

1.4. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.4.1. **Diffusionscelle**

En diffusionscelle består af et donorkammer og et receptorkammer, hvorimellem huden anbringes (en typisk udformning er vist i figur 1). Cellen skal slutte tæt omkring huden og skal lette prøvetagning fra og opblanding af receptoropløsningen, som er i kontakt med undersiden af huden, og skal derudover give gode muligheder for temperaturregulering af cellen og dens indhold. Både statiske diffusionsceller og gennemstrømningsceller kan godtages. Donorkammeret er sædvanligvis utillukket under eksponering for en endelig dosis af testpræparatet, men kan være tillukket ved ubegrænsede doser og ved visse scenarier med endelig dosis.

▼B

1.4.2. **Receptorvæske**

En receptorvæske af fysiologisk karakter må foretrækkes, men også væske af anden art kan anvendes, når dette begrundes. Receptorvæskens nøjagtige sammensætning skal angives. Det skal godtgøres, at teststoffet er tilstrækkelig opløseligt i receptorvæsken, så denne ikke virker som en barriere for absorptionen. Desuden må receptorvæsken ikke påvirke hudpræparatets integritet. I gennemstrømningssystemer må gennemstrømningshastigheden ikke være sådan, at den hæmmer teststoffets diffusion til receptorvæsken. I systemer med statisk celle skal væsken være under konstant omrøring, og der skal regelmæssigt tages prøver af væsken. Undersøges metabolismen, skal receptorvæsken kunne holde huden levende under hele forsøget.

1.4.3. **Hudpræparater**

Hud fra mennesker eller dyr kan anvendes. Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser. Levende hud må foretrækkes, men også ikke-levende hud kan anvendes, forudsat at hudens integritet kan godtgøres. Såvel membraner bestående af epidermis (fraspaltet ad enzymatisk, termisk eller kemisk vej) som delhudspræparater (tykkelse typisk 200-400 μm) fremstillet med dermatom, kan godtages. Hud i fuld tykkelse kan anvendes, men for stor tykkelse (> ca. 1 mm) må undgås, medmindre det specielt er nødvendigt til bestemmelse af teststoffet i hudens forskellige lag. Den valgte art, anatomiske placering og præparationsteknik skal begrundes. Der kræves acceptable data fra mindst fire gentagelser for hvert testpræparat.

1.4.4. **Hudpræparatets integritet**

Korrekt præparation af huden er afgørende. Ved uhensigtsmæssig håndtering kan stratum corneum blive beskadiget, hvorfor integriteten af den præparerede hud må kontrolleres. Undersøges hudmetabolisme, skal huden anvendes snarest muligt efter excisionen og ved betingelser, der vides at støtte den metaboliske aktivitet. Som hovedregel skal nyeksciseret hud anvendes inden for 24 timer, men den acceptable opbevaringsperiode kan afhænge af det enzymsystem, der deltager i metaboliseringen, samt af opbevaringstemperaturen (13). For hudpræparater, der har været opbevaret inden brug, skal der forelægges dokumentation for, at barrierefunktionen er bevaret.

1.4.5. **Teststof**

Teststoffet er den enhed, hvis penetrationsegenskaber skal undersøges. Ideelt bør teststoffet være radioaktivt mærket.

1.4.6. **Testpræparat**

Testpræparatet (f.eks. ufortyndet, fortyndet eller formuleret materiale, der indeholder teststoffet og påføres huden) skal være det samme (eller en realistisk erstatning herfor) som det, mennesker eller andre potentielle målarter kan blive eksponeret for. Enhver afvigelse fra det »ibrugværende« præparat skal begrundes.

▼B

1.4.7. **Teststoffets koncentration og formuleringer**

Normalt anvendes flere koncentrationer af teststoffet, således at overgrænsen for potentiel eksponering af mennesker er inkluderet. Tilsvarende må det overvejes at teste en række typiske formuleringer.

1.4.8. **Påføring på huden**

Når mennesker eksponeres for kemiske stoffer, er der sædvanligvis tale om endelige doser. For at påføringen skal modsvare forholdene ved eksponering af mennesker, skal der således normalt anvendes 1-5 mg/cm$^2$ hud for faste stoffer og indtil 10 µl/cm$^2$ for væsker. Mængden skal være begrundet i de forventede anvendelsesbetingelser, undersøgelsens målsætning eller testpræparatets fysiske egenskaber. F.eks. kan påføringen på hudoverfladen svare til »ubegrænset«, når der anvendes et stort volumen pr. arealenhed.

1.4.9. **Temperatur**

Kemiske stoffers passive diffusion (og dermed deres hudabsorption) er temperaturafhængig. Diffusionskammeret og huden skal holdes ved konstant temperatur tæt på den normale hudtemperatur på 32 ± 1 ºC. Forskellige cellekonstruktioner kræver forskellig temperatur af vandbad eller varmeplade for at sikre, at receptor/hud er i det fysiologiske normalområde. Fugtigheden skal helst være mellem 30 og 70 %.

1.4.10. **Varighed af eksponering og prøvetagning**

Eksponeringen af huden for testpræparatet kan strække sig over hele forsøgets varighed eller over kortere tid (med henblik på efterligning af en given type human eksponering). Overskydende testpræparat vaskes af huden med et passende rengøringsmiddel, og vaskevandet opsamles til analyse. Fremgangsmåden ved fjernelse af testpræparatet bør afhænge af de forventede anvendelsesbetingelser og skal begrundes. Normalt kræves en prøvetagningsperiode på 24 timer for at få en fyldestgørende karakterisering af absorptionsprofilen. Da hudens integritet kan begynde at forringes efter 24 timer, bør prøvetagningstidspunkterne normalt ikke strække sig ud over 24 timer. Så lang en periode er ikke nødvendigvis påkrævet for teststoffer, der hurtigt trænger gennem huden, men til testning af langsomt penetrerende teststoffer kan længere tid behøves. Prøvetagning fra receptorvæsken skal ske med en frekvens, der gør det muligt at optegne en kurve over teststoffets absorptionsprofil.

1.4.11. **Afsluttende procedurer**

Alle testsystemets komponenter analyseres, og genfindingsgraden bestemmes. Det gælder donorkammer, skyllevand til hudoverflade, hudpræparat og receptorvæske/-kammer. I nogle tilfælde kan huden opdeles i det eksponerede hudareal og hudarealet under celleflangen, samt i fraktioner bestående af stratum corneum, epidermis og dermis, som analyseres hver for sig.

1.4.12. **Analyse**

I alle undersøgelser skal opnås tilstrækkelig genfinding (målet bør være et gennemsnit på 100 ± 10 % af radioaktiviteten, og eventuel afvigelse herfra skal begrundes). Teststofindhold i receptorvæske, hudpræparat, vaskevand fra hudoverfladen og skyllevand fra apparaturet bestemmes med en egnet metode.

▼B

2. **DATA**

Der redegøres for analysen af receptorvæsken, teststoffets fordeling i testsystemet, og absorptionsprofilens sammenhæng med tiden. Når der eksponeres ved betingelser svarende til en begrænset dosis, beregnes mængde vasket af huden, mængde bundet til huden (og til de forskellige hudlag, hvis disse analyseres) samt mængde i receptorvæsken (hastighed og mængde eller procentdel af påført dosis). Hudabsorption kan undertiden udtrykkes alene med receptorvæskedata. Når der er teststof tilbage i huden ved slutningen af undersøgelsen, kan det dog være nødvendigt at medregne det i den samlede absorberede mængde (se punkt 66 i henvisning (3)). Når der eksponeres med ubegrænset dosis, kan data gøre det muligt at beregne en permeabilitetskonstant (Kp). I så fald er den absorberede procentdel ikke relevant.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal dække de krav, der er fastsat i protokollen, herunder en begrundelse for det anvendte testsystem, og skal omfatte følgende:

Teststof:

— fysisk form, fysisk-kemiske egenskaber (i det mindste molekylvægt og log $P_{ow}$), renhed (radiokemisk renhed)

— identifikationsoplysninger (f.eks. batchnummer)

— opløselighed i receptorvæske.

Testpræparat:

— formulering og begrundelse for dens anvendelse

— homogenitet.

Forsøgsbetingelser:

— kilder og hudområde, præparationsmetode, opbevaringsbetingelser inden brug, eventuel forbehandling (rengøring, antibiotisk behandling osv.), målinger af hudintegritet, metabolisk status, begrundelse for valget

— cellens udformning, receptorvæskens sammensætning, receptorvæskens gennemstrømningshastighed eller prøvetagningstidspunkter og -metoder

— nærmere oplysninger om påføring af testpræparatet og kvantificering af den påførte dosis

— eksponeringens varighed

— nærmere beskrivelse af fjernelsen af testpræparatet fra huden, f.eks. skylning af huden

— nærmere beskrivelse af hudanalyse og eventuelle fraktioneringsteknikker, der anvendt til at vise fordelingen i huden

▼B

— metoder til vask af celle og udstyr

— assaymetoder, ekstraktionsteknikker, detektionsgrænser og validering af analysemetoder.

Resultater:

— totale genfindingsværdier i forsøget (påført dosis ≡ hudvaskevand + hud + receptorvæske + vand fra celleskylninger)

— tabeller over genfindingen i hver af disse afdelinger

— absorptionsprofil

— absorptionsdata i tabelform (udtrykt som hastighed, mængde eller procentdel).

Diskussion af resultaterne

Konklusioner

4. **REFERENCER**

(1) Testmetode B.44. Hudabsorption: in vivo-metode.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro* Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd ChemTox, 37, 191-205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

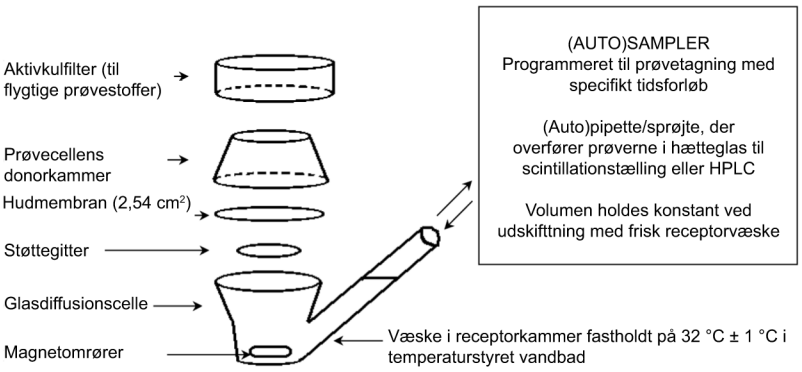
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C, Heylings, J.R., Clowes, H.M. And Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

*Figur 1*

**Eksempel på typisk udformning af statisk diffusionscelle til in vitro-undersøgelse af perkutan absorption**



▼M3

B.46. **IN VITRO-HUDIRRITATION: TESTMETODE MED REKONSTRUERET HUMAN EPIDERMIS**

INDLEDNING

1. Hudirritation defineres som fremkomsten af reversible hudskader efter påføring af testkemikalie i op til 4 timer [som defineret i FN's globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (GHS) og Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (1) (3)]. Denne testmetode (TM) omfatter en in vitro-procedure, som kan anvendes til fareidentifikation af lokalirriterende stoffer (stoffer og blandinger) i kategori 2 ifølge FN GHS og EU CPL (1) (2) (3). I EU og andre regioner, der ikke har indført den valgfrie kategori 3 ifølge FN GHS (milde lokalirriterende stoffer), kan denne TM også anvendes til at identificere ikkeklassificerede stoffer, dvs. stoffer i FN GHS og EU CLP »Ingen kategori« (1) (3). Denne TM kan anvendes til at bestemme stoffers hudirritation og udgøre en selvstændig erstatningstest for in vivo-testning for hudirritation i en trindelt testningsstrategi (4) og kapitel B.4 i dette bilag).

2. Vurderingen af hudirritation har typisk omfattet brug af forsøgsdyr [OECD Test Guideline 404, kapitel B.4 i dette bilag] (4). Af hensyn til dyrevelfærden blev B.4 revideret i 2004 og giver nu mulighed for at bestemme hudætsning/hudirritation ved hjælp af en trindelt teststrategi, der består af validerede in vitro- eller ex vivo-metoder, hvorved det undgås, at dyr udsættes for smerter og lidelser. Der er blevet vedtaget tre in vitro-testmetoder — OECD Test Guidelines 430, 431 og 435 (5) (6) (7) — hvoraf to er indføjet som kapitel B.40 og B.40a i dette bilag, som er relevante for ætsningsdelen af den trindelte teststrategi beskrevet i B.4 eller OECD Test Guideline 404 (4).

3. Denne TM's endepunkt for menneskers sundhed er hudirritation. Den bygger på rekonstrueret human epidermis (RhE), som på grund af dets overordnede udformning (brug af humant afledte ikketransformerede epidermiskeratinocytter som cellekilde og brug af repræsentativt væv og cellearkitektur) ret nøje efterligner de biokemiske og fysiologiske egenskaber i de øvre dele af menneskers hud, dvs. epidermis. Denne TM rummer også et sæt ydeevnestandarder (tillæg 2) til brug for vurdering af lignende og modificerede RhE-baserede metoder udviklet af Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) (8) i overensstemmelse med principperne i OECD Guidance Document No. 34 (9).

4. Der er tre validerede metoder, der følger denne TM. En in vitro-testmetode, hvor der benyttes en RhE-model, som forhandles under betegnelsen EpiSkin™ (den validerede referencemetode — VRM), har været underkastet prævaliderings-, optimerings- og valideringsundersøgelser (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20). To andre in vitro-RhE-metoder til testning af hudirritation, som fås i handelen, har vist samme resultater som VRM-metoden i en validering baseret på ydeevnestandarder (21), nemlig EpiDerm™ SIT (EPI-200)- og SkinEthic™ RHE-metoderne (22).

▼M3

5. Inden en foreslået lignende eller modificeret in vitro-RhE-metode ud over VRM-, EpiDerm™ SIT (EPI-200)- eller SkinEthic™ RHE-metoderne kan benyttes i forbindelse med lovgivningen, skal dens pålidelighed og relevans (nøjagtighed) og grænserne for dens påtænkte anvendelse bestemmes, så det er sikkert, at den på de punkter er sammenlignelig med VRM-metoden, og det skal ske i overensstemmelse med ydeevnestandarderne i denne TM (tillæg 2). Det anbefales desuden at konsultere OECD's baggrundsdokument om in vitro-testning for hudirritation inden udvikling og validering af en lignende eller modificeret in vitro-RhE-metode og fremlæggelse af lovforslag til vedtagelse (23).

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

7. Der er en begrænsning for TM'en, som påvist i valideringsundersøgelsen (16), nemlig at den ikke giver mulighed for klassificering af kemikalier i den valgfrie kategori 3 ifølge FN GHS (milde lokalirriterende stoffer) (1). Når den benyttes som en delvis erstatningstest, kan det være nødvendigt at udføre en opfølgende in vivo-test for at bedømme det fulde potentiale for hudirritation (4 og kapitel B.4 i dette bilag). Det anerkendes, at brugen af human hud er underlagt nationale og internationale etiske hensyn og betingelser.

8. Denne TM er relevant for in vitro-hudirritationsdelen af den trindelte teststrategi beskrevet i B.4 (OECD Test Guideline 404) om hudirritation/ætsning (4). Selv om denne TM ikke giver fyldestgørende oplysninger om hudætsning, skal det bemærkes, at B.40a (OECD Test Guideline 431) om hudætsning er baseret på det samme RhE-testsystem, skønt der anvendes en anden protokol (kapitel B.40a). Denne metode er baseret på RhE-modeller, hvor der anvendes humane keratinocytter, som derfor in vitro repræsenterer de pågældende arters målorgan. Den omfatter endvidere direkte det indledende trin i den inflammatoriske kaskade/aktionsmekanisme (cellebeskadigelse og vævsbeskadigelse, der forårsager lokalt traume), som forekommer i forbindelse med in vivo-irritation. Der er blevet testet en lang række forskellige kemikalier i forbindelse med valideringen af denne TM, og den empiriske database for valideringsundersøgelsen omfattede 58 kemikalier i alt (16) (18) (23). Den kan benyttes til test af faste stoffer, væsker, halvfaste stoffer og vokser. Væsker kan være vandige eller ikkevandige, og faste stoffer kan være opløselige eller uopløselige i vand. Faste stoffer skal males til et fint pulver, før de påføres, når det overhovedet er muligt. Der kræves ingen anden forbehandling af teststoffet. Gasser og aerosoler er endnu ikke vurderet ved en valideringsundersøgelse (24). Selv om det er tænkeligt, at disse stoffer kan undersøges ved hjælp af RhE-teknologi, muliggør den nuværende TM ikke undersøgelse af gasser og aerosoler. Det skal bemærkes, at kraftigt farvede kemikalier kan interferere med målingen af cellelevedygtighed og behovet for at anvende tilpassede kontrolprøver til korrektioner (se punkt 24-26).

9. En analyseserie bestående af tre vævsgentagelser bør være tilstrækkelig for et teststof, når klassificeringen er entydig. I tilfælde af tvetydige resultater såsom diskordante gentagne målinger, og/eller hvis den gennemsnitlige levedygtighed er 50 ± 5 %, skal det overvejes at lave en anden analyseserie samt en tredje, hvis resultaterne af de første to analyseserier er diskordante.

▼M3

TESTPRINCIPPET

10. Teststoffet påføres på en tredimensional RhE-model, som består af ikke-transformerede humant afledte epidermiskeratinocytter, som ved dyrkning har dannet en stærkt differentieret flerlagsmodel af den humane epidermis. Den består af velordnede basallag, stratum spinosum og stratum granulosum og et flerlaget stratum corneum med intercellulære lamellære lipidlag fra samme lipidklasser, som dem man finder in vivo.

11. Kemikalieinduceret hudirritation i form af erytem og ødem er resultatet af en kaskade af begivenheder, der indledes med gennemtrængning af stratum corneum og beskadigelse af de underliggende keratinocytlag. De døende keratinocytter frigiver mediatorer, der starter den inflammatoriske kaskade, der påvirker cellerne i dermis, navnlig de stromale og endotele celler. Det er dilatationen og den øgede permeabilitet i de endotele celler, som producerer den observerede erytem og ødem (24). Ved de RhE-baserede metoder måles de udløsende begivenheder i kaskade.

12. Cellernes levedygtighed i RhE-modeller måles ved, at enzym omdanner vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt; CAS-nr. 298-93-1)] til et blåt formazansalt, der måles kvantitativt efter ekstraktion fra vævene (25). Lokalirriterende stoffer identificeres ved deres evne til at nedsætte cellernes levedygtighed til en bestemt tærskelværdi eller derunder (f.eks. ≤ 50 % for lokalirriterende stoffer i kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP). Afhængigt af de lovgivningsrammer, inden for hvilke resultaterne af denne TM anvendes, kan kemikalier, der fører til en levedygtighed for cellerne, der ligger over den fastlagte tærskel, betragtes som ikkeirriterende stoffer (dvs. > 50 % »Ingen kategori«).

GODTGØRELSE AF KOMPETENCE

13. Inden et laboratorium påbegynder rutinemæssig brug af en valideret metode, der følger denne TM, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved hjælp af de 10 anbefalede referencekemikalier i tabel 1. For lignende testmetoder, der udvikles under denne TM, eller modificeringer af en af de tre validerede metoder skal ydeevnestandarderne i tillæg 2 til denne TM opfyldes inden anvendelse af metoden i lovgivningsøjemed.

14. Som led i godtgørelsen af kompetence anbefales det, at brugeren kontrollerer vævenes barriereegenskaber efter modtagelse som beskrevet i RhE-modellen. Det er navnlig vigtigt, hvis vævene sendes over lang afstand/lange perioder. Når en metode er blevet helt fastlagt, og kompetencen er blevet godtgjort, er det ikke nødvendigt at kontrollere disse egenskaber rutinemæssigt. Ved rutinemæssig brug af en metode anbefales det imidlertid at kontrollere barriereegenskaberne med jævne mellemrum.

*Tabel 1*

**Referencekemikalier** ([1])

| Kemisk stof | CAS-nr. | In vivo-score ([2]) | Fysisk form | UN GHS-/EU CLP-kategori |
|---|---|---|---|---|
| naphthaleneddikesyre | 86-87-3 | 0 | Fast | Ingen kat. |
| isopropanol | 67-63-0 | 0,3 | Flydende | Ingen kat. |

▼M3

| Kemisk stof | CAS-nr. | In vivo-score ([2]) | Fysisk form | UN GHS-/EU CLP-kategori |
|---|---|---|---|---|
| methylstearat | 112-61-8 | 1 | Fast | Ingen kat. |
| heptylbutyrat | 5870-93-9 | 1,7 | Flydende | Ingen kat. (*Valgfri kat. 3*) ([3]) ([4]) |
| hexylsalicylat | 6259-76-3 | 2 | Flydende | Ingen kat. (*Valgfri kat. 3*) ([3]) ([4]) |
| cyclamenaldehyd | 103-95-7 | 2,3 | Flydende | Kat. 2 |
| 1-bromhexan | 111-25-1 | 2,7 | Flydende | Kat. 2 |
| kaliumhydroxid (5 % aq.) | 1310-58-3 | 3 | Flydende | Kat. 2 |
| 1-methyl-3-phenyl-1-piperazin | 5271-27-2 | 3,3 | Fast | Kat. 2 |
| heptanal | 111-71-7 | 3,4 | Flydende | Kat. 2 |

([1]) Disse referencekemikalier udgør en delmængde af de referencekemikalier, der anvendes i valideringsundersøgelsen.
([2]) In vivo-score i overensstemmelse med B.4 og OECD Test Guideline 404 (4).
([3]) I denne testmetode betragtes stoffer i den valgfrie kategori 3 (milde lokalirriterende stoffer) i FN GHS som ikkeklassificerede (»Ingen kategori«).
([4]) Kategori 3 i FN GHS anvendes ikke i henhold til EU CLP.

TESTPROCEDURE

15. Nedenfor følger en beskrivelse af komponenter og procedurer i en RhE-metode til vurdering af hudirritation. En RhE-model kan konstrueres, fremstilles internt eller købes i handelen. Standardprocedurer (SOP) for EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) og SkinEthic™ RHE er tilgængelige (26) (27) (28). Test bør udføres på følgende måde:

**Komponenterne i rhe-testmetoden**

*Almindelige betingelser*

16. Der skal anvendes ikketransformerede humane keratinocytter til at konstruere epithelet. Der skal være flere lag af levedygtige epithelceller (basallag, stratum spinosum, stratum granulosum) til stede under et fungerende stratum corneum. Stratum corneum skal være flerlaget og indeholde den fedtprofil, der gør den til en effektiv barriere, der kan modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske markørstoffer, f.eks. SDS eller Triton X-100. Barrierefunktionen kan bedømmes enten ved at bestemme den koncentration, hvor et markørstof nedsætter vævets levedygtighed med 50 % ($IC_{50}$) efter en fast eksponeringstid, eller ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte levedygtigheden med 50 % ($ET_{50}$), når markørstoffet påføres i en nærmere angivet fast koncentration. RhE-modellens fysiske udformning skal forhindre, at stof passerer uden om stratum corneum til det levedygtige væv, hvilket ville forringe modelleringen af hudens eksponering. RhE-modellen skal være fri for kontamination med bakterier, virus, mykoplasma og svampe.

▼M3

*Funktionsmæssige betingelser*

Levedygtighed

17. MTT-assayet foretrækkes til kvantificering af levedygtigheden (25). Brugerne af RhE-modellen skal sikre, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder de fastlagte kriterier for den negative kontrol (NC). Absorbansen (optisk densitet — OD) af det rene ekstraktionsmiddel skal være tilstrækkelig lav, dvs. OD < 0,1. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen skal fastsætte et interval (øvre og nedre grænse) for acceptable OD-værdier for negativ kontrol (i metodebetingelserne for hudirritationstesten), og acceptintervallerne for de tre validerede metoder er angivet i tabel 2. Det skal godtgøres, at vævet fra behandling med negativ kontrol er en stabil kultur (leverer enslydende levedygtighedsmålinger) i hele testeksponeringsperioden.

*Tabel 2*

**Intervaller for acceptable OD-værdier for negativ kontrol**

| | Nedre acceptgrænse | Øvre acceptgrænse |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) | ≥ 0,6 | ≤ 1,5 |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200) | ≥ 1,0 | ≤ 2,5 |
| SkinEthic™ RHE | ≥ 1,2 | ≤ 2,5 |

Barrierefunktion

18. Stratum corneum og dets lipidsammensætning skal være tilstrækkelig til at modstå hurtig gennemtrængning af cytotoksiske markørstoffer, f.eks. SDS eller Triton X-100, bestemt ved $IC_{50}$ eller $ET_{50}$ (tabel 3).

Morfologi

19. Der skal udføres en histologisk undersøgelse af RhE-modellen for human epidermis-lignende struktur (herunder flerlaget stratum corneum).

Reproducerbarhed

20. Resultaterne af testmetoden med positive (PC) og negative (NC) kontrolprøver skal udvise tidsmæssig reproducerbarhed.

Kvalitetskontrol

21. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen skal sikre og påvise, at hver batch af den anvendte RhE-model overholder veldefinerede produktionsgodkendelseskriterier, hvoraf *levedygtighed* (punkt 17), *barrierefunktion* (punkt 18) og *morfologi* (punkt 19) er de vigtigste. Brugerne af metoden skal have adgang til disse data, således at de kan medtage disse oplysninger i testrapporten. Udvikleren/leverandøren af RhE-modellen (eller forsøgslederen, hvis modellen er internt fremstillet) skal fastsætte et interval for acceptable værdier af $IC_{50}$ eller $ET_{50}$ (øvre og nedre grænse). Kun resultater, der er fremkommet med kvalificerede væv, kan accepteres til at give en pålidelig vurdering af lokalirriterende klassificering. Nedenfor er acceptintervallerne for de tre validerede metoder angivet som eksempler i tabel 3.

▼M3

*Tabel 3*

**Eksempler på batchgodkendelseskriterier til kvalitetskontrol**

| | Nedre acceptgrænse | Øvre acceptgrænse |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM)<br>(behandling i 18 timer med SDS) (26) | $IC_{50}$ = 1,0 mg/ml | $IC_{50}$ = 3,0 mg/ml |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200)<br>(1 % Triton X-100) (27) | $ET_{50}$ = 4,8 t | $ET_{50}$ = 8,7 t |
| SkinEthic™ RHE<br>(1 % Triton X-100) (28) | $ET_{50}$ = 4,0 t | $ET_{50}$ = 9,0 t |

*Påføring af test- og kontrolstoffer*

22. Der anvendes mindst tre vævsgentagelser for hvert testkemikalie og til kontroller pr. analyseserie. For både flydende og faste stoffer gælder det, at der skal påføres tilstrækkelig meget testkemikalie til, at epidermisoverfladen dækkes med et jævnt lag, samtidig med at uendelig dosis undgås, dvs. mindst 25 µL/cm$^2$ eller 25 mg/cm$^2$. I tilfælde af faste stoffer fugtes epidermisoverfladen med deioniseret eller destilleret vand inden påføringen, så kontakten mellem det kemiske teststof og epidermisoverfladen forbedres. Faste stoffer bør testes som fint pulver, når det overhovedet er muligt. Efter eksponeringsperioden vaskes teststoffet omhyggeligt af epidermisoverfladen med vandig buffer eller 0,9 % NaCl. Afhængigt af, hvilke af de tre validerede RhE-metoder der anvendes, kan eksponeringsperioden variere mellem 15 og 60 minutter og inkubationstemperaturen mellem 20 og 37 °C. Disse eksponeringsperioder og temperaturer optimeres for hver RhE-metode og repræsenterer metodernes forskellige iboende egenskaber. Der er nærmere oplysninger i de tre metoders standardprocedurer (SOP) (26) (27) (28).

23. Der skal i hver analyseserie anvendes sideløbende negative og positive kontroller (PC), så det godtgøres, at levedygtigheden (NC), barrierefunktionen og vævets deraf følgende følsomhed (med kontrolstoffet) ligger inden for et forud fastsat acceptinterval. Som positivt kontrolstof foreslås 5 % vandig SDS. Som negativt kontrolstof foreslås vand eller phosphatbufferet saltopløsning (PBS).

*Måling af cellelevedygtighed*

24. Det vigtigste i testproceduren er, at levedygtigheden ikke måles umiddelbart efter eksponeringen med testkemikalierne, men først efter en tilstrækkelig lang inkubationsperiode i frisk substrat af de renskyllede væv fra behandlingen. En sådan periode betyder, dels at huden kan kommer sig over svagt cytotoksiske virkninger, dels at eventuelle cytotoksiske virkninger træder tydeligt frem. En inkubationsperiode efter behandlingen på 42 timer viste sig i testoptimeringsfasen (11) (12) (13) (14) (15) at være optimal.

25. MTT-assayet er en valideret kvantitativ metode, som skal benyttes til måling af cellelevedygtigheden i forbindelse med denne TM. Den er forenelig med brug i et tredimensionalt væv. Vævsprøven anbringes i en MTT-opløsning af passende koncentration (f.eks. 0,3-1 mg/ml) i tre timer. Det udfældede blå formazan ekstraheres fra vævet med et opløsningsmiddel (f.eks. isopropanol eller sur isopropanol), og formazankoncentrationen beregnes ud fra måling af absorbansen i et højst ± 30 nm bredt filterbånd ved 570 nm.

▼M3

26. Teststoffets optiske egenskaber eller dets kemiske reaktion med MTT kan interferere med målingen og føre til et forkert skøn over levedygtigheden (da teststoffet kan standse, mindske eller forårsage farvedannelsen). Det kan forekomme, hvis et specifikt testkemikalie ikke bliver fjernet fuldstændigt fra vævet ved skylning, eller hvis det er trængt ned i epidermis. Hvis teststoffet reagerer direkte med MTT (MTT-opløsning), hvis det selv er farvet, eller hvis det bliver farvet under behandlingen af vævet, skal der anvendes yderligere kontroller til at spore og korrigere for teststoffernes interferens med levedygtighedsmålingen. Det er nærmere beskrevet, hvordan der korrigeres for MTT-reduktion og farvestoffernes interferens, i SOP'erne for de tre validerede metoder (26) (27) (28).

*Acceptkriterier*

27. For hver metode med gyldige RhE-modelbatcher (se punkt 21) skal væv, der er behandlet med negativ kontrol, give absorbansresultater, der afspejler kvaliteten af de væv, der har været underkastet alle forsendelses- og modtagelsestrin og alle protokolprocesser. Absorbansværdierne af kontrollerne må ikke ligge lavere end forud fastsatte nedre grænser. På tilsvarende måde skal væv, der er behandlet med positiv kontrol, dvs. 5 % vandig SDS, afspejle vævenes evne til at reagere på et lokalirriterende stof under aktuelle forsøgsvilkår (26) (27) (28). Der skal defineres passende mål for den tilknyttede variation mellem multiple bestemmelser på samme væv (f.eks. skal en eventuel standardafvigelse ligge inden for det ensidige toleranceinterval på 95 % beregnet på grundlag af historiske data, der for VRM-standardafvigelser er ≤ 18 %).

*Fortolkning af resultater og prædiktionsmodel*

28. De absorbansværdier, som måles ved hver undersøgelse, anvendes til beregning af den procentuelle levedygtighed i forhold til den negative kontrol, som vilkårligt sættes til 100 %. Den tærskelværdi for cellelevedygtighedsprocent, som adskiller lokalirriterende stoffer fra ikkeklassificerede stoffer, og de statistiske metoder, der benyttes til at vurdere resultaterne og udpege lokalirriterende stoffer, skal klart defineres, dokumenteres og bevises at være hensigtsmæssige. Tærskelværdierne for vurdering som lokalirriterende er som følger:

— Teststoffet betragtes som værende hudirriterende i kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP, hvis vævslevedygtigheden efter eksponering og inkubation efter behandling er mindre end eller lig med (≤) 50 %

— Afhængigt af de lovgivningsrammer, inden for hvilke resultaterne af denne TM anvendes, betragtes teststoffet som værende ikkehudirriterende ifølge FN GHS/EU CLP »Ingen kategori«, hvis vævslevedygtigheden efter eksponering og inkubation efter behandling er større end (>) 50 %.

DATA OG RAPPORTERING

*Data*

29. For hver analyseserie skal data fra de enkelte multipelbestemmelser (f.eks. absorbansværdier og beregnet cellelevedygtighedsprocent for hvert testkemikalie samt klassificeringen) fremlægges i tabelform, herunder data fra eventuelle gentagelser af forsøget. Desuden skal gennemsnit og standardafvigelse angives for hver analyseserie. For hvert testkemikalie oplyses der om eventuelt iagttagne vekselvirkninger med MTT-reagenset og farvede teststoffer.

▼**M3**

*Testrapport*

30. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— kemiske navne, f.eks. CAS-navn og -nummer, hvis de kendes

— stoffets renhed og sammensætning (i vægtprocent)

— fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen (f.eks. fysisk tilstand, stabilitet og flygtighed, pH og opløselighed i vand, hvis kendt)

— eventuel behandling af test-/kontrolstoffet inden testen (f.eks. opvarmning, formaling)

— opbevaringsforhold.

Begrundelse for valg af RhE-model og forsøgsprotokol.

Testbetingelser:

— anvendt cellesystem

— komplet dokumentation for den anvendte RhE-model, herunder om dens ydeevne. Der skal bl.a. gives oplysning om:

  i) levedygtighed

  ii) barrierefunktion

  iii) morfologi

  iv) reproducerbarhed og prædiktionsevne

  v) kvalitetskontroller (QC) i modellen

— detaljer om den anvendte testprocedure

— anvendte testdoser, eksponeringens varighed og længden af inkubationsperioden efter behandlingen

— beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren

— reference til historiske data for modellen. Der skal bl.a. gives oplysning om:

  i) om QC-dataene kan accepteres, sammenlignet med data om tidligere batcher

  ii) om positive og negative kontrolværdier kan accepteres, sammenlignet med gennemsnit og intervaller for positive og negative kontroller

— beskrivelse af de anvendte evalueringskriterier, herunder begrundelse for valg af prædiktionsmodellens afskæringspunkt(er)

— reference til historiske kontroldata.

▼M3

Resultater:

— angivelse i tabelform af data fra hvert enkelt testkemikalie for hver analyseserie og fra hver flergangsbestemmelse

— angivelse af kontrolprøver anvendt til direkte MTT-opløsninger og/eller farvede teststoffer

— beskrivelse af andre observerede virkninger.

Behandling af resultater

Konklusioner

LITTERATUR

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Available at: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html]

(2) EC-ECVAM (2009), Statement on the »Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards«, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006. EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(5) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 430, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(6) OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 431, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(9) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No. 34, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765–770.

▼M3

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests — An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., mailto:Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto:Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559-601.

(17) Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(18) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy — Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351-358.

(20) EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(22) EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(23) OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No. 137, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html]

(24) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231-243.

▼**M3**

(25) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55-63.

(26) EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(27) EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for: *In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(28) SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. Available at: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(29) Harvell, J.D., Lamminstausta, K., and Maibach, H.I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(30) Commission Directive 2001/59/EC of 6 August 2001 adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances, OJ L 225, 21.8.2001, p.1.

(31) Basketter, D.A., York, M., McFadden, J.P. and Robinson, M.K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1-4.

(32) Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359-365.

(33) Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109-116.

▼M3

*Tillæg 1*

**Definitioner**

*Nøjagtighed:* Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (9).

*Cellelevedygtighed:* En parameter, der måler den samlede aktivitet i en cellepopulation, f.eks. udtrykt ved de cellulære mitokondriedehydrogenasers evne til at reducere vitalfarvestoffet MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, thiazolylblåt], og som, afhængigt af det valgte endepunkt og testens udformning, korrelerer med det totale antal levende celler og/eller deres levedygtighed.

*Konkordans:* Den er et mål for ydeevnen af en testmetode, der fører til kategoriske resultater, og er et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes som synonym for »nøjagtighed« og defineres som andelen af alle kemikalier, der klassificeres korrekt som positive eller negative. (9).

$ET_{50}$: Kan bedømmes ved at bestemme den eksponeringstid, der er nødvendig for at nedsætte cellernes levedygtighed med 50 % ved påføring af et markørstof i en nærmere angivet fast koncentration; se også $IC_{50}$.

*EU CLP (Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger):* Gennemfører FN's globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier (stoffer og blandinger) (GHS) i Den Europæiske Union (EU) (3).

*De Forenede Nationers (FN) GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier]):* Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om kemikaliernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (1).

$IC_{50}$: Kan bedømmes ved at bestemme den koncentration, hvor et markørstof nedsætter vævets levedygtighed med 50 % ($IC_{50}$) efter en fast eksponeringstid; se også $ET_{50}$.

*Uendelig dosis:* Den mængde testkemikalie, som er påført på epidermis ud over den mængde, der er nødvendig for helt at dække epidermisoverfladen på ensartet måde.

*Me-too-test:* Gængs udtryk for en testmetode, som strukturelt og funktionelt ligner en valideret og anerkendt referencetestmetode. En sådan testmetode underkastes ofte en catch-up-validering. Benyttes som synonym for tilsvarende testmetode (9).

*Ydeevnestandarder (PS):* Standarder, som med udgangspunkt i en valideret testmetode giver mulighed for at vurdere, om en foreslået testmetode, som er mekanistisk og funktionelt tilsvarende, er sammenlignelig. De indeholder bl.a.: i) de centrale dele af testmetoden, ii) en minimumsliste med referencekemikalier, som er udvalgt blandt de kemikalier, der er benyttet til at påvise, at den validerede testmetodes ydeevne er acceptabel, iii) de sammenlignelige niveauer af nøjagtighed og pålidelighed, som er fastsat efter, hvad der er opnået med den validerede testmetode, og som det skal påvises, at den foreslåede testmetode kan yde, ved vurdering ud fra minimumslisten med referencekemikalier (9).

▼**M3**

*Referencekemikalier:* Kemikalier, der anvendes i valideringsprocessen, hvor respons i in vitro- eller in vivo -referencetestsystemet eller de pågældende arter allerede er kendt. Disse kemikalier skal være repræsentative for de kemiske stofgrupper, som testmetoden forventes at blive anvendt på, og skal repræsentere hele det forventede responsområde for de kemikalier, som den anvendes til, fra kraftig til svag eller negativ respons. Det kan være nødvendigt at anvende forskellige referencekemikalier i de forskellige faser i valideringsprocessen og til forskellige testmetoder og testformål (9).

*Relevans:* Beskrivelse af sammenhængen mellem testen og den pågældende virkning og dens meningsfuldhed og brugbarhed til et bestemt formål. Det angives, i hvilket omfang testen måler eller forudsiger den pågældende biologiske virkning korrekt. Testmetodens nøjagtighed (konkordans) indgår i vurderingen af dens relevans (9).

*Pålidelighed:* Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (9).

*Erstatningstest:* En test, der erstatter en test, der bruges rutinemæssigt og er godkendt til fareidentifikation og/eller risikovurdering, og som vurderes at sikre en tilsvarende eller bedre beskyttelse af menneskers og dyrs sundhed eller miljøet alt afhængigt af situationen i forhold til den godkendte test, til alle testsituationer og alle kemikalier (9).

*Følsomhed:* Andelen af alle positive/aktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af en testmetodes relevans (9).

*Hudirritation:* Fremkaldelse af reversibel skade på huden ved påføring af teststoffet i indtil 4 timer. Hudirritation er en lokalt fremkaldt ikkeimmunogen reaktion, som indtræder kort tid efter stimuleringen (29). Den karakteriseres især ved, at den reversible proces indebærer inflammatoriske reaktioner og de fleste af de karakteristiske kliniske tegn på irritation (rødme, ødem, kløe og smerte), der er knyttet til en inflammatorisk proces.

*Specificitet:* Andelen af alle negative/inaktive testkemikalier, der klassificeres korrekt ved testen. Den er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, der fører til kategoriske resultater, og har stor betydning for vurdering af en testmetodes relevans (9).

*Trindelt testningsstrategi:* Testning, hvor der anvendes sekventielle testmetoder. Testmetoderne på de enkelte trin udvælges på grundlag af resultaterne på det tidligere testtrin (9).

*Testkemikalie (eller teststof):* Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M3

*Tillæg 2*

**Ydeevnestandarder til brug for vurdering af foreslåede lignende eller modificerede in vitro-(rhe)-metoder med rekonstrueret human epidermis for hudirritation**

INDLEDNING

1. Formålet med ydeevnestandarder er at fastslå grundlaget for bedømmelsen af nye metoder, både beskyttede (dvs. ophavsretsbeskyttede, varemærkebeskyttede og registrerede) og ikkebeskyttede, som værende tilstrækkelig nøjagtige og pålidelige til bestemte testformål. Disse ydeevnestandarder for validerede og anerkendte testmetoder kan anvendes til at evaluere pålideligheden og nøjagtigheden af andre analoge metoder (i daglig tale »me-too«-test), som er baseret på lignende videnskabelige principper, og til at måle eller forudsige den samme biologiske eller toksiske effekt (9).

2. Inden indførelsen af modificerede metoder, dvs. foreslåede potentielle forbedringer af en godkendt metode, skal der foretages en bedømmelse af de foreslåede ændringers effekt på testresultatet og af, i hvilket omfang disse ændringer berører de oplysninger, der er tilgængelige for de øvrige dele i valideringsprocessen. Afhængigt af antallet og arten af de foreslåede ændringer, de genererede data og støttedokumentation for disse ændringer, skal de enten underkastes den samme valideringsproces som beskrevet for en ny test eller, hvis det er hensigtsmæssigt, en begrænset vurdering af pålideligheden og relevansen på grundlag af anerkendte ydeevnestandarder (9).

3. Lignende (me-too-) eller modificerede metoder af de tre validerede metoder [EpiSkin™ (den validerede referencemetode — VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) og SkinEthic™ RHE], der foreslås anvendt i forbindelse med denne TM, skal vurderes med hensyn til pålidelighed og nøjagtighed ved hjælp af kemikalier, der repræsenterer hele Draize-pointskalaen for irritation. Når foreslåede testmetoder bedømmes ved hjælp af de 20 anbefalede referencekemikalier, der opfylder ydeevnestandarderne (tabel 1), skal de foreslåede lignende eller modificerede metoder have samme niveau af pålidelighed og nøjagtighed som VRM eller et højere niveau (tabel 2) (2) (16). De nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier, der skal opnås, er angivet i punkt 8-12 i dette tillæg. Der indgår ikkeklassificerede og klassificerede (FN GHS/EU CLP »Ingen kategori«) og klassificerede (kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP) (1) kemikalier, således at pålideligheden og nøjagtigheden med hensyn til følsomhed, specificitet og generel nøjagtighed af den foreslåede testmetode kan sammenlignes med VRM. Inden metoden tages i brug til test af nye kemikalier, skal det fastslås, om den er pålidelig og — afhængigt af lovgivningsrammerne, inden for hvilke dataene genereres — om den kan identificere hudirriterende kemikalier i kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP »Ingen kategori« korrekt.

4. Disse ydeevnestandarder er baseret på EU-ECVAM (8), der er opdateret i overensstemmelse med FN's GHS- og EU's CLP-system for klassificering og mærkning (1) (3). De oprindelige ydeevnestandarder blev fastlagt efter afslutning af valideringsundersøgelsen (21) og var baseret på EU's klassificeringssystem som fastlagt i Kommissionens direktiv 2001/59/EF af 6. august 2001 om 28. tilpasning til den tekniske udvikling af Rådets direktiv 67/548/EØF om tilnærmelse af lovgivning om klassificering, emballering og etikettering af farlige stoffer ([1]). Som følge af vedtagelsen

([1]) EFT L 225 af 21.8.2001, s. 1.

▼M3

af FN's GHS-system for klassificering og mærkning i EU ((EU CLP) (3), der skete i perioden mellem afslutningen af valideringsundersøgelsen og færdiggørelsen af denne TM, er ydeevnestandarderne blevet opdateret (8). Denne opdatering vedrører navnlig ændringer af i) PS-referencekemikalierne og ii) de fastlagte nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier (2) (23).

YDEEVNESTANDARDER TIL BRUG FOR IN VITRO-RhE-TESTMETODER FOR HUDIRRITATION

5. Ydeevnestandarderne omfatter følge tre elementer (9):

I) De centrale dele af testmetoden

II) Minimumsliste over referencekemikalier

III) Definerede nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier

I) **De centrale dele af testmetoden**

6. Disse indeholder central strukturelle, funktionelle og metodemæssige dele af en valideret metode, der skal inkluderes i protokollen for en foreslået lignende eller modificeret metode, der er mekanistisk og funktionelt tilsvarende. Disse dele omfatter unikke karakteristika ved metoden, kritiske metodemæssige detaljer og kvalitetskontrolforanstaltninger. Inkluderingen af de centrale dele af testmetoden vil medvirke til at sikre, at en lignende eller modificeret foreslået metode er baseret på samme begreber som den tilsvarende VRM (9). De centrale dele af testmetoden beskrives nærmere i punkt 16-21 i TM'en, og test bør udføres på følgende måde:

— Almindelige modelbetingelser (punkt 16).

— Funktionsmæssige betingelser, der omfatter:

— levedygtighed (punkt 17)

— barrierefunktion (punkt 18)

— morfologi (punkt 19)

— reproducerbarhed (punkt 20)

— kvalitetskontrol (punkt 21)

II) **Minimumsliste over referencekemikalier**

7. Referencekemikalier benyttes til at fastslå, om en foreslået lignende eller modificeret metode, som er bevist at have tilstrækkelig strukturel og funktionel lighed med VRM, eller som består i en mindre modifikation af en af de tre validerede metoder, har samme niveau af pålidelighed og nøjagtighed som VRM (2) (8) (16) (23). De 20 anbefalede referencekemikalier i tabel 1 omfatter kemikalier fra forskellige kemiske stofgrupper (dvs. kemiske kategorier baseret på funktionelle grupper) og repræsenterer hele Draize-pointskalaen (fra ikkeirriterende til stærkt irriterende). På listen er der 10 kemikalier i kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP og 10 ikkeklassificerede kemikalier, heraf tre kemikalier i den valgfrie kategori 3 ifølge FN GHS. I denne testmetode betragtes stoffer i den valgfrie kategori 3 som ikkeklassificerede (»Ingen kategori«). Kemikalierne i tabel 1 udvælges blandt de kemikalier, der anvendes i optimeringsfasen efter prævalideringen og i VRM-valideringsundersøgelsen, på grundlag af kemisk funktion og fysisk form (14) (18). Disse referencekemikalier er det mindste antal kemikalier, der skal indgå i vurderingen af nøjagtighed og pålidelighed af en foreslået lignende eller modificeret metode, men bør ikke anvendes til

▼M3

udvikling af nye metoder. Hvis et stof på listen ikke kan fås, kan der benyttes andre kemikalier, som der foreligger tilstrækkelige in vivo-referencedata om, primært de kemikalier, der anvendes i optimeringsfasen efter prævalideringen eller i VRM-valideringsundersøgelsen. Hvis det ønskes for at udbygge vurderingen af den foreslåede metodes nøjagtighed, kan der tilføjes flere kemikalier, som repræsenterer andre kemiske stofgrupper, og som der foreligger tilstrækkelige in vivo-referencedata om, til minimumslisten over referencekemikalier.

*Tabel 1*

**Minimumslisten over referencestoffer til bestemmelse af nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier for lignende eller modificerede RhE-metoder til testning af hudirritation** [1]

| Kemikalie | CAS-nummer | Fysisk form | In vivo-vurdering | VRM in vitro-kategori | FN GHS/EU CLP in vivo-kategori |
|---|---|---|---|---|---|
| 1-brom-4-chlorbutan | 6940-78-9 | Flydende | 0 | Kat. 2 | Ingen kat. |
| diethylphthalat | 84-66-2 | Flydende | 0 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| naphthaleneddikesyre | 86-87-3 | Fast | 0 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| allylphenoxyacetat | 7493-74-5 | Flydende | 0,3 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| isopropanol | 67-63-0 | Flydende | 0,3 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| 4-(methylthio)-benzaldehyd | 3446-89-7 | Flydende | 1 | Kat. 2 | Ingen kat. |
| methylstearat | 112-61-8 | Fast | 1 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| heptylbutyrat | 5870-93-9 | Flydende | 1,7 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| hexylsalicylat | 6259-76-3 | Flydende | 2 | Ingen kat. | Ingen kat. |
| cinnamaldehyd | 104-55-2 | Flydende | 2 | Kat. 2 | Ingen kat. (*Valgfri kat. 3*) [3] |
| *1-decanol* [2] | *112-30-1* | *Flydende* | *2,3* | *Kat. 2* | *Kat. 2* |
| cyclamenaldehyd | 103-95-7 | Flydende | 2,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 1-bromhexan | 111-25-1 | Flydende | 2,7 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 2-chlormethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridin HC1 | 86604-75-3 | Fast | 2,7 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| *di-n-propyldisulfid* [2] | *629-19-6* | *Flydende* | *3* | *Ingen kat.* | *Kat. 2* |
| kaliumhydroxid (5 % aq.) | 1310-58-3 | Flydende | 3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| benzenthiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl | 7340-90-1 | Flydende | 3,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| 1-methyl-3-phenyl-1-piperazin | 5271-27-2 | Fast | 3,3 | Kat. 2 | Kat. 2 |

▼M3

| Kemikalie | CAS-nummer | Fysisk form | In vivo-vurdering | VRM in vitro-kategori | FN GHS/EU CLP in vivo-kategori |
|---|---|---|---|---|---|
| heptanal | 111-71-7 | Flydende | 3,4 | Kat. 2 | Kat. 2 |
| tetrachlorethylen | 127-18-4 | Flydende | 4 | Kat. 2 | Kat. 2 |

([1]) Kemikalierne er udvalgt på grundlag af følgende kriterier: i) kemikalierne fås i handelen, ii) de repræsenterer hele Draize-pointskalaen (fra ikkeirriterende til stærkt irriterende), iii) de har en veldefineret kemisk struktur, iv) de er repræsentative for de typer kemisk funktion, der indgår i valideringsprocessen, og de har ikke nogen ekstremt toksisk profil (f.eks. kræftfremkaldende eller reproduktionstoksiske) og indebærer heller ikke urimeligt høje bortskaffelsesomkostninger.

([2]) Kemikalier, der er irriterende for kaniner, men hvor der foreligger pålidelig dokumentation for, at de er ikkeirriterende for mennesker (31) (32) (33).

([3]) I henhold til FN GHS, ikke i henhold til EU CLP.

III) **Definerede nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier**

8. Med henblik på at fastslå pålideligheden og relevansen af foreslåede lignende eller modificerede metoder, der ønsker overført mellem laboratorier, skal alle 20 referencekemikalier i tabel 1 testes i mindst tre laboratorier. Hvis den foreslåede metode kun skal anvendes i et laboratorium, er der imidlertid ikke noget krav om testning i flere laboratorier i forbindelse med valideringen. Det er imidlertid af afgørende betydning, at sådanne valideringsundersøgelser vurderes af internationalt anerkendte uafhængige valideringsorganer i overensstemmelse med internationale retningslinjer (9). I hvert laboratorium skal alle 20 referencekemikalier testes ved uafhængige analyseserier, der foretages med forskellige vævsbatcher og på tilstrækkeligt adskilte tidspunkter. Hver analyseserie skal bestå af minimum tre parallelt testede vævsgentagelser for hvert inkluderet testkemikalie og negative og positive kontrolprøve.

9. Beregningen af den foreslåede testmetodes nøjagtigheds- og pålidelighedsværdier skal foretages under hensyntagen til alle fire nedennævnte kriterier under ét, således at det sikres, at alle værdierne for nøjagtighed og pålidelighed beregnes på en forud fastlagt og konsekvent måde.

   1. Kun data fra analyseserier i komplette analysesekvenser kan anvendes som grundlag for beregningen af metodevariationen og prædiktionsevnen (nøjagtigheden) inden for laboratoriet og mellem laboratorier.

   2. Hvert deltagende laboratorium skal fastsætte den endelige klassificering af de enkelte referencekemikalier ud fra gennemsnittet af levedygtigheden over de forskellige analyseserier i en komplet analysesekvens.

   3. Kun data fra kemikalier, som har komplette analysesekvenser i alle deltagende laboratorier, kan anvendes som grundlag for beregningen af metodevariationen mellem laboratorier.

   4. Beregningen af nøjagtighedsværdierne skal foretages på grundlag af de forskellige deltagende laboratorier egne forudsigelser for de 20 referencekemikalier.

   I denne forbindelse består en **analysesekvens** af tre uafhængige analyseserier fra et laboratorium for et testkemikalie. En **komplet analysesekvens** er en analysesekvens fra et laboratorium for et testkemikalie, hvor alle tre serier er gyldige. Dette indebærer, at en enkelt ugyldig analyseserie ugyldiggør hele analyseserien af de tre analyseserier.

*Reproducerbarhed inden for laboratoriet*

10. En vurdering af reproducerbarheden inden for laboratoriet skal vise, at klassificeringerne (kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP og »Ingen kategori«) ved forskellige uafhængige analyseserier med de 20 referencekemikalier i ét enkelt laboratorium er overensstemmende i 90 % af tilfældene eller derover.

▼M3

*Reproducerbarhed mellem laboratorier*

11. En vurdering af reproducerbarheden mellem laboratorier er ikke afgørende, hvis de foreslåede metoder kun skal benyttes i ét laboratorium. For metoder, der ønskes overført mellem laboratorier, skal klassificeringerne (kategori 2 ifølge FN GHS/EU CLP og »Ingen kategori«) ved forskellige uafhængige analyseserier med de 20 referencekemikalier, der foretages i helst mindst tre laboratorier, være overensstemmende i 80 % af tilfældene eller derover.

*Prædiktionsevne (nøjagtighed)*

12. Nøjagtigheden med hensyn til følsomhed, specificitet og generel nøjagtighed af en foreslået lignende eller modificeret metode skal være sammenlignelig eller bedre end nøjagtigheden af en VRM under hensyntagen til yderligere oplysninger om relevansen i de pågældende arter (tabel 2). Følsomheden skal være 80 % eller derover (2) (8) (23). Der er imidlertid en yderligere særlig begrænsning for følsomheden af den foreslåede in vitro-metode, da kun to in vivo-kemikalier i kategori 2, *1-decanol* og *di-n-propyldisulfid,* må fejlklassificeres som ikkeklassificerede (»Ingen kategori«) af mere end et deltagende laboratorium. Specificiteten skal være 70 % eller derover (2) (8) (23). Der er ingen yderligere begrænsning med hensyn til specificiteten af den foreslåede in vitro-metode, dvs. at de deltagende laboratorier kan fejlklassificere ethvert ikkeklassificeret in vivo-kemikalie, så længe testmetodens endelige specificitet ligger inden for det acceptable interval. Den generelle nøjagtighed skal være 75 % eller derover (2) (8) (23). Selv om den beregnede følsomhed af VRM for de 20 referencekemikalier i tabel 1 er 90 %, skal den definerede minimumsfølsomhedsværdi for en lignende eller modificeret metode være 80 % for at kunne blive betragtet som gyldig, da både *1-decanol* (et borderline-kemikalie) og *di-n-propyl propyldisulfid* (et falsk negativ af VRM) vides at være ikkeirriterende for mennesker (31) (32) (33), selv om de er identificeret som lokalirriterende stoffer i kanintesten. Eftersom RhE-modeller er baseret på celler af menneskelig oprindelse, kan de anvendes til at identificere disse kemikalier som ikkeirriterende (FN GHS/EU CLP »Ingen kategori«).

*Tabel 2*

**Krævet prædiktionsevne for nøjagtighed med hensyn til følsomhed, specificitet og generel nøjagtighed, for at en lignende eller modificeret metode skal kunne betragtes som gyldig**

| Følsomhed | Specificitet | Generel nøjagtighed |
|---|---|---|
| ≥ 80 % | ≥ 70 % | ≥ 75 % |

*Undersøgelsesacceptkriterier*

13. Det er muligt, at et eller flere forsøg vedrørende et eller flere kemikalier opfylder/ikke opfylder acceptkriterierne for test- og kontrolstofferne eller ikke kan accepteres af andre årsager. Der kan foretages højst to yderligere forsøg (»gentagelse af forsøg«) for hvert testkemikalie for at supplere manglende data. Da der ved gentagelse af forsøg skal anvendes sideløbende negative og positive kontroller, må der mere præcist udføres højst to yderligere analyseserier for hvert testkemikalie.

14. Selv efter gentagelse af forsøg er det tænkeligt, at kravet om mindst tre gyldige analyseserier for hvert testkemikalie ikke opfyldes for hvert enkelt referencekemikalie i alle deltagende laboratorier, hvilket resulterer i en ufuldstændig datamatrix. I disse tilfælde skal følgende tre kriterier alle opfyldes, for at datasættene skal kunne betragtes som acceptable:

    1. Alle 20 referencekemikalier skal have mindst en komplet analysesekvens.

▼**M3**

2. I mindst tre deltagende laboratorier skal mindst 85 % af analysesekvenserne være komplette (for 20 kemikalier, dvs. at tre ugyldige analysesekvenser i et laboratorium tillades).

3. Mindst 90 % af alle mulige analysesekvenser fra mindst tre laboratorier skal være komplette (for 20 kemikalier testet i tre laboratorier, dvs. at i alt seks ugyldige analysesekvenser tillades).

▼M2

B.47. **OKSECORNEA-UKLARHEDS- OG -PERMEABILITETSTESTMETODEN (BCOP-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER**

INDLEDNING

1. Oksecornea-uklarheds- og -permeabilitetstestmetoden (BCOP [Bovine Corneal Opacity and Permeability]-testmetoden) er en *in vitro*-testmetode, som under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger kan anvendes til at klassificere stoffer og blandinger som »øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer« (1) (2) (3). For denne testmetode er stærkt øjenirriterende stoffer defineret som dem, der inducerer øjenlæsioner, der persisterer hos kaninen i mindst 21 dage efter administration. Selv om den ikke betragtes som gyldig som fuldstændig erstatning for *in vivo*-kaninøjentesten, anbefales BCOP anvendt som del af en trindelt testningsstrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning inden for et specifikt anvendelsesområde (domæne) (4) (5). Teststoffer og -blandinger (6) kan klassificeres som øjenætsende stoffer eller stærkt øjenirriterende stoffer uden yderligere testning hos kaniner. Et stof, der er testet negativt, vil skulle testes hos kaniner ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi som anført i OECD Test Guideline 405 (7) (kapitel B. 5 i dette bilag).

2. Formålet med denne testmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et teststofs potentielle øjenætsning eller stærke øjenirritation som målt ved dets evne til at inducere uklarhed og øget permeabilitet i en isoleret oksecornea. Toksiske virkninger på cornea måles ved: (i) nedsat lystransmission (uklarhed) og (ii) øget passage af farvestoffet natriumfluorescein (permeabilitet). Uklarheds- og permeabilitetsvurderingerne af cornea efter eksponering for et teststof kombineres til udledning af en *in vitro*-irritationsscore (IVIS, *In Vitro* Irritancy Score), som anvendes til at klassificere teststoffets irritationsniveau.

3. Øjenirriterende stoffer, som inducerer læsioner, der forsvinder på mindre end 21 dage, og ikke-øjenirriterende stoffer er også testet ved anvendelse af BCOP-testmetoden. BCOP-testmetodens nøjagtighed og pålidelighed for stoffer i disse kategorier er imidlertid ikke vurderet formelt.

4. Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE BETRAGTNINGER OG BEGRÆNSNINGER

5. Denne testmetode er baseret på Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) BCOP Test Method Protocol (8), som blev udviklet efter en international valideringsundersøgelse (4) (5) (9) med bidrag fra European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) og Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM). Protokollen er baseret på oplysninger fra Institute for In Vitro Sciences (IIVS) og INVITTOX Protocol 124 (10), som er den protokol, der blev anvendt til den af De Europæiske Fællesskaber sponsorerede prævalideringsundersøgelse af BCOP-assayet, som blev gennemført i 1997-1998. Begge disse protokoller er baseret på BCOP-assaymetodikken, som først blev rapporteret af Gautheron *et al.* (11).

▼M2

6. De identificerede begrænsninger for denne testmetode er baseret på de høje falsk positiv-rater for alkoholer og ketoner og den høje falsk negativ-rate for faste stoffer i valideringsdatabasen (se punkt 44) (5). Når stoffer i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres BCOP's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (5). Som følge af formålet med dette assay (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-rater ikke kritiske, eftersom sådanne stoffer efterfølgende vil blive testet hos kaniner eller med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi med en »weight of evidence«-tilgang. Den nuværende valideringsdatabase har desuden ikke muliggjort en tilstrækkelig vurdering af visse kemiske stofgrupper eller produktgrupper (f.eks. blandinger). Undersøgerne vil imidlertid kunne overveje at anvende denne testmetode til alle typer af testmateriale (herunder blandinger), hvor et positivt resultat vil kunne accepteres som indikativt for en øjenætsningsrespons eller svær øjenirritationsrespons. Positive resultater for alkoholer eller ketoner bør dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

7. Alle procedurer med okseøjne og oksecorneae skal følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (12).

8. Testmetoden har den begrænsning, at selv om den tager højde for nogle af de øjenvirkninger, som vurderes i kaninøjenirritationstestmetoden, og til en vis grad deres sværhedsgrad, tager den ikke højde for conjunctiva- og irisskader. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med BCOP-assayet, men det er på grundlag af kaninøjenundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at skelne mellem irreversible og reversible virkninger (13). Endelig muliggør BCOP-testmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

9. Der er bestræbelser i gang for yderligere at karakterisere anvendeligheden af og begrænsningerne for BCOP-assayet til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (se også punkt 45). Brugerne opfordres også til at forsyne valideringsorganisationer med prøver og/eller data med henblik på formel vurdering af mulige fremtidige anvendelser af BCOP-testmetoden, herunder anvendelse til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer.

10. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af BCOP-testmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af BCOP-assaydata med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTMETODEN

11. BCOP-testmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder normal fysiologisk og biokemisk funktion af oksecornea *in vitro*. Ved denne testmetode vurderes teststoffets beskadigende virkning ved kvantitative målinger af ændringer i cornea-uklarhed og -permeabilitet med henholdsvis et opacitometer og et spektrofotometer til synligt lys. Begge målinger anvendes til at beregne en IVIS, som anvendes til at tildele en *in vitro*-irritationsfareklassificeringskategori med henblik på forudsigelse af et teststofs *in vivo*-øjenirritationspotentiale (se Beslutningskriterier).

▼M2

12. I BCOP-testmetoden anvendes isolerede corneae fra øjnene fra friskslagtet kvæg. Cornea-uklarhed måles kvantitativt som omfanget af lystransmission gennem cornea. Permeabilitet måles kvantitativt som mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der passerer gennem den fulde tykkelse af cornea som detekteret i mediet i det bageste kammer. Teststofferne tilføres til cornea-epiteloverfladen ved tilsætning til corneaholderens forreste kammer. I tillæg 3 findes en beskrivelse af og et diagram over en corneaholder, som anvendes i BCOP-testmetoden. Corneaholdere kan købes i handelen fra forskellige kilder eller konstrueres.

**Kilde til okseøjne og deres alder samt udvælgelse af dyrearter**

13. Kvæg, som sendes til slagterier, aflives typisk enten med henblik på anvendelse til konsum eller anden kommerciel udnyttelse. Kun raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes som kilde til corneae til brug i BCOP-testen. Eftersom vægtintervallet for kvæg er bredt og afhænger af race, alder og køn, er der ingen anbefalet vægt for dyrene på slagtetidspunktet.

14. Der kan forekomme variationer i corneadimensioner ved anvendelse af øjne fra dyr med forskellig alder. Corneae med en vandret diameter > 30,5 mm og værdier for den centrale corneatykkelse (CCT) på ≥ 1 100 μm stammer i almindelighed fra kvæg, som er mere end otte år gamle, mens corneae med en vandret diameter < 28,5 mm og CCT < 900 μm i almindelighed stammer fra kvæg, som er mindre end fem år gamle (14). Derfor anvendes der typisk ikke øjne fra kvæg, som er mere end 60 måneder gamle. Øjne fra kvæg, som er mindre end 12 måneder gamle, har traditionelt ikke været anvendt, eftersom disse øjne stadig er i udviklingsfasen, og corneatykkelsen og -diameteren er betydeligt mindre end det rapporterede for øjne fra voksent kvæg. Anvendelse af corneae fra yngre (dvs. 6-12 måneder gamle) dyr er imidlertid tilladelig, eftersom det giver visse fordele, såsom øget tilgængelighed, et snævert aldersinterval og nedsat risiko for potentiel arbejdstagereksponering for bovin spongiform encefalopati (BSE) (15). Da yderligere vurdering af betydningen af corneastørrelse eller -tykkelse for responsen på ætsende og irriterende stoffer ville være nyttig, opfordres brugerne til at rapportere den estimerede alder og/eller vægt for de dyr, hvorfra de corneae, der undersøges, stammer.

**Indsamling og transport af øjne til laboratoriet**

15. Øjnene indsamles af slagteriarbejdere. For at minimere mekanisk og anden beskadigelse af øjnene skal de enukleeres hurtigst muligt efter dyrenes aflivning. For at hindre, at øjnene eksponeres for potentielt irriterende stoffer, må slagteriarbejderne ikke anvende rensemiddel, når de skyller dyrenes hoveder.

16. Øjnene skal nedsænkes helt i Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) i en beholder med en passende størrelse og transporteres til laboratoriet på en sådan måde, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Eftersom øjnene indsamles under slagteprocessen, vil de kunne blive eksponeret for blod og andre biologiske substanser, herunder bakterier og andre mikroorganismer. Det er derfor vigtigt at sikre, at risikoen for kontaminering minimeres (f.eks. ved at opbevare beholderen med øjnene på våd is, ved at tilsætte antibiotika til den HBSS, som øjnene opbevares i under transport [f.eks. penicillin i en koncentration på 100 IE/ml og streptomycin i en koncentration på 100 mg/ml]).

▼M2

17. Tidsintervallet mellem indsamling af øjnene og anvendelsen af corneae i BCOP-testen skal minimeres (typisk indsamling og anvendelse samme dag), og det skal påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene, såvel som de positive og negative kontrolresponser. Alle de øjne, som anvendes i assayet, skal stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

**Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i BCOP-testen**

18. Når øjnene er ankommet til laboratoriet, undersøges de omhyggeligt for defekter, herunder øget uklarhed, ridser og neovaskularisering. Der anvendes kun corneae fra øjne, som er fri for sådanne defekter.

19. Kvaliteten af hver enkelt cornea vurderes også på senere assaytrin. Corneae med en uklarhed på mere end syv uklarhedsenheder (BEMÆRK: opacitometeret skal kalibreres med uklarhedsstandarder, som anvendes til at fastlægge uklarhedsenhederne, se tillæg 3) efter en indledende entimes ligevægtsindstillingsperiode skal kasseres.

20. Hver behandlingsgruppe (teststof, samtidige negative og positive kontroller) består af minimum tre øjne. Der skal anvendes tre corneae som negative kontrolcorneae i BCOP-assayet. Eftersom alle corneae ekscideres fra det hele øjeæble og anbringes i corneakamrene, er der mulighed for håndteringsforårsagede artefakter i de individuelle cornea-uklarheds- og -permeabilitetsværdier (inklusive negativ kontrol). Uklarheds- og permeabilitetsværdierne for de corneae, der fungerer som negativ kontrol, anvendes desuden til at korrigere uklarheds- og -permeabilitetsværdierne for testartikel- og positiv kontrol-behandlede corneae i IVIS-beregningerne.

TESTPROCEDURE

**Klargøring af øjnene**

21. Corneae, som er fri for defekter, fridissekeres således, at der stadig er en 2-3 mm sclerakant tilbage til hjælp ved efterfølgende håndtering, idet det tilstræbes at undgå at beskadige cornea-epitelet og -endotelet. Isolerede corneae anbringes i specialdesignede corneaholdere, der består af forreste og bageste rum, som grænser op til henholdsvis epitel- og endotelsiden af cornea. Begge kamre fyldes rigeligt op med forvarmet Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (bageste kammer først), idet det sikres, at der ikke dannes bobler. Derpå bringes anordningen i ligevægt ved 32 ± 1 °C i mindst en time for at gøre det muligt for corneae at komme i ligevægt med mediet og opnå normal metabolisk aktivitet i den grad, det er muligt (den tilnærmelsesvise temperatur af cornea-overfladen *in vivo* er 32 °C).

22. Efter ligevægtsindstillingsperioden tilsættes frisk forvarmet EMEM til begge kamre, og der aflæses basislinje-uklarhed for hver cornea. Alle corneae, som har makroskopisk vævsbeskadigelse (f.eks. ridser, pigmentering, neovaskularisering) eller en uklarhed > 7 uklarhedsenheder, kasseres. Den gennemsnitlige uklarhed for alle corneae, som er bragt i ligevægt, beregnes. Minimum tre corneae med uklarhedsværdier tæt på medianværdien for alle corneae udvælges som negative (eller opløsningsmiddel-) kontrolcorneae. De resterende corneae fordeles derpå i en behandlingsgruppe og en positiv kontrolgruppe.

▼M2

23. Eftersom varmekapaciteten for vand er højere end for luft, giver vand mere stabile temperaturbetingelser til inkubering. Derfor anbefales det at benytte et vandbad til at holde corneaholderen og dens indhold ved 32 ± 1 °C. Der kan dog også anvendes luftinkubatorer under forudsætning af omhyggelig opretholdelse af temperaturstabilitet (f.eks. ved forvarmning af holdere og medier).

**Applikation af teststoffet**

24. Der anvendes to forskellige behandlingsprotokoller - en for væsker og overfladeaktive stoffer (faste stoffer eller væsker) og en for ikke-overfladeaktive stoffer.

25. Væsker testes ufortyndede, mens overfladeaktive stoffer testes ved en koncentration på 10 % vægt/volumen i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt. Halvfaste stoffer, cremer og vokser testes typisk som væsker. Der skal gives passende begrundelse for alternative fortyndingskoncentrationer. Corneae eksponeres for væsker og overfladeaktive stoffer i 10 minutter. Anvendelse af andre eksponeringstider skal ledsages af tilstrækkeligt videnskabeligt rationale.

26. Ikke-overfladeaktive faste stoffer testes typisk som opløsninger eller opslæmninger ved en koncentration på 20 % i en 0,9 % natriumchloridopløsning, destilleret vand eller et andet opløsningsmiddel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt. Under visse omstændigheder og med behørig videnskabelig begrundelse kan faste stoffer også testes i ren form ved direkte applikation på cornea-overfladen ved anvendelse af metoden med åbent kammer (se punkt 29). Corneae eksponeres for faste stoffer i fire timer, men som for væsker og overfladeaktive stoffer kan der anvendes alternative eksponeringstider med tilstrækkeligt videnskabeligt rationale.

27. Der kan anvendes forskellige behandlingsmetoder alt efter teststoffets fysiske natur og kemiske egenskaber (f.eks. faste stoffer, væsker, viskøse kontra ikke-viskøse væsker). I den forbindelse er det absolut påkrævet at sikre, at teststoffet dækker epiteloverfladen tilstrækkeligt, og at det fjernes tilstrækkeligt under skylletrinene. Der anvendes typisk en metode med lukket kammer for ikke-viskøse til let viskøse flydende teststoffer, mens der typisk anvendes en metode med åbent kammer for halvviskøse og viskøse flydende teststoffer og for rene faste stoffer.

28. Ved metoden med lukket kammer indføres der tilstrækkeligt teststof (750 µl) til at dække cornea-epitelsiden i det forreste kammer gennem doseringshullerne på kammerets overside, og hullerne lukkes efterfølgende med kammerpropperne under eksponeringen. Det er vigtigt at sikre, at hver cornea eksponeres for et teststof i det rette tidsinterval.

29. Ved metoden med åbent kammer fjernes vindueslåseringen og glasvinduet fra det forreste kammer inden behandling. Kontrol- eller teststoffet (750 µl - nok teststof til at dække cornea helt) påføres direkte på cornea-epiteloverfladen ved anvendelse af en mikropipette. Hvis et teststof er vanskeligt at pipettere, kan teststoffet fyldes i en pipette med positiv fortrængning under tryk som hjælp til dosering. Pipettespidsen på pipetten med positiv fortrængning indsættes i sprøjtens doseringsspids, således at materialet kan fyldes over i fortrængningsspidsen under tryk. Samtidig trykkes sprøjtestemplet ned, efterhånden som pipettestemplet trækkes opad. Hvis der dukker luftbobler op i pipettespidsen, fjernes testartiklen (den presses ud), og processen gentages, indtil spidsen er fyldt uden luftbobler. Om nødvendigt kan der anvendes en normal sprøjte (uden kanyle), eftersom en sådan sprøjte dels muliggør afmåling af et nøjagtigt volumen teststof og dels letter applikation på cornea-epiteloverfladen. Efter doseringen sættes glasvinduet på plads på det forreste kammer for at genskabe et lukket system.

▼M2

**Inkubering efter eksponering**

30. Efter eksponeringsperioden fjernes teststoffet, den negative kontrol eller det positive kontrolstof fra det forreste kammer, og epitelet vaskes mindst tre gange (eller indtil der ikke længere er synlige tegn på teststof) med EMEM (som indeholder phenolrødt). Der anvendes phenolrødt-holdigt medium til skylning, eftersom et farveskift for phenolrødt kan anvendes som indikator for effektiviteten af bortskylning af sure eller basiske materialer. Corneae vaskes mere end tre gange, hvis indikatoren phenolrødt stadig er misfarvet (gul eller violet), eller hvis teststoffet stadig er synligt. Når teststoffet er fjernet fra mediet, foretages en afsluttende skylning af corneae med EMEM (uden phenolrødt). EMEM (uden phenolrødt) anvendes til afsluttende skylning for at sikre fjernelse af phenolrødt fra det forreste kammer inden uklarhedsmålingen. Derefter fyldes det forreste kammer igen med frisk EMEM uden phenolrødt.

31. For væsker eller overfladeaktive stoffer inkuberes corneae efter skylning i yderligere to timer ved 32 ± 1 °C. Længere tid efter eksponering kan være nyttig under visse omstændigheder og kan overvejes i hvert enkelt tilfælde. Corneae, som er behandlet med faste stoffer, skylles grundigt ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode, men kræver ikke yderligere inkubering.

32. Ved afslutningen af inkuberingsperioden efter eksponeringen for væsker og overfladeaktive stoffer og ved afslutningen af den fire timer lange eksponeringsperiode for ikke-overfladeaktive faste stoffer registreres uklarheden og permeabiliteten for hver cornea. Desuden observeres hver cornea visuelt, og væsentlige observationer registreres (f.eks. vævsafskalning, resterende teststof, uensartede uklarhedsmønstre). Disse observationer kan være vigtige, da de kan give sig udslag i variationer i opacitometeraflæsningerne.

**Kontrolstoffer**

33. Der indgår samtidige negative eller opløsningsmiddel/vehikel-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

34. Ved test af et flydende stof i en koncentration på 100 % medtages der ved BCOP-testmetoden en samtidig negativ kontrol (f.eks. 0,9 % natriumchloridopløsning eller destilleret vand), således at der kan detekteres ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Det sikrer også, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

35. Ved test af fortyndet væske, overfladeaktivt stof eller fast stof medtages der ved BCOP-testmetoden en samtidig opløsningsmiddel/vehikel-kontrolgruppe, således at der kan detekteres ikke-specifikke ændringer i testsystemet og opnås en basislinje for assayets endepunkter. Kun et opløsningsmiddel/vehikel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt, kan anvendes.

36. Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom BCOP-assayet anvendes i denne testmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, skal den positive kontrol ideelt set være et referencestof, som inducerer en svær respons ved denne testmetode. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af irritationsresponsen imidlertid ikke være overdrevent stor.

37. Eksempler på positive kontroller for flydende teststoffer er dimethylformamid eller 1 % natriumhydroxid. Et eksempel på en positiv kontrol for faste teststoffer er 20 % (vægt/volumen) imidazol i 0,9 % natriumchloridopløsning.

▼M2

38. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialet for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentiale for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponser.

**Målte endepunkter**

39. Uklarhed bestemmes ud fra omfanget af lystransmission gennem cornea. Cornea-uklarhed måles kvantitativt ved hjælp af et opacitometer, hvorved der opnås uklarhedsværdier målt på en kontinuert skala.

40. Permeabilitet bestemmes ud fra mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag (dvs. fra epitelet på den udvendige cornea-overflade til endotelet på den indvendige cornea-overflade). Der tilsættes 1 ml natriumfluoresceinopløsning (henholdsvis 4 mg/ml ved test af væsker og overfladeaktive stoffer og 5 mg/ml ved test af ikke-overfladeaktive faste stoffer) til det forreste kammer i corneaholderen, som grænser op til epitelsiden af cornea, mens det bageste kammer, som grænser op til endotelsiden af cornea, fyldes med frisk EMEM. Derpå inkuberes holderen i vandret position i 90 ± 5 min ved 32 ± 1 °C. Mængden af natriumfluorescein, der kommer ind i det bageste kammer, måles kvantitativt ved hjælp af UV/VIS-spektrofotometri. Spektrofotometriske målinger vurderet ved 490 nm registreres som $OD_{490}$- (OD = optisk tæthed) eller absorbansværdier, som måles på en kontinuert skala. Fluoresceinpermeabilitetsværdierne bestemmes ved anvendelse af $OD_{490}$-værdier, som er opnået med et spektrofotometer til synligt lys ved brug af en 1 cm standardvejlængde.

41. Der kan alternativt anvendes en 96-brønds mikrotiterpladeaflæser, forudsat at (i) pladeaflæserens lineære interval for bestemmelse af fluorescein-$OD_{490}$-værdier kan fastlægges; og at (ii) volumenet af fluoresceinprøverne i 96-brønds pladen er korrekt, således at der opnås $OD_{490}$-værdier svarende til 1 cm standardvejlængden (dette kan kræve en helt fuld brønd [sædvanligvis 360 ml]).

DATA OG RAPPORTERING

**Datavurdering**

42. Efter at uklarhedsværdier og gennemsnitlige permeabilitets-($OD_{490}$-)værdier er korrigeret for baggrundsuklarheds- og negativ kontrol-permeabilitets-$OD_{490}$-værdier, skal den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitets-$OD_{490}$-værdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en empirisk udledt formel for at beregne en *in vitro*-irritationsscore (IVIS) for hver behandlingsgruppe som følger:

IVIS = gennemsnitlig uklarhedsværdi + (15 × gennemsnitlig permeabilitets-$OD_{490}$-værdi)

Sina et al. (16) rapporterede, at denne formel blev udledt under interne og sammenlignende laboratorieundersøgelser. Data genereret for i alt 36 forbindelser i en undersøgelse med deltagelse af flere laboratorier blev underkastet flerdimensional analyse for at bestemme ligningen for den bedste tilpasning mellem in vivo- og in vitro-data. Denne analyse blev udført af forskere i to forskellige virksomheder, som udledte næsten identiske ligninger.

43. Uklarheds- og permeabilitetsværdierne bør også vurderes uafhængigt for at fastslå, om et teststof kun inducerede ætsning eller stærk irritation ud fra ét af de to endepunkter (se Beslutningskriterier).

▼M2

**Beslutningskriterier**

44. Et stof, som inducerer en IVIS ≥ 55,1, defineres som et ætsende stof eller stærkt irriterende stof. Som anført i punkt 1 skal der, hvis teststoffet ikke identificeres som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof, gennemføres yderligere testning med henblik på klassificering og mærkning. BCOP-testmetoden har en generel nøjagtighed på 79 % (113/143) til 81 % (119/147), en falsk positiv-rate på 19 % (20/103) til 21 % (22/103) og en falsk negativ-rate på 16 % (7/43) til 25 % (10/40) i sammenligning med *in vivo*-kaninøjentestmetodedata klassificeret i henhold til EPA- (1), EU- (2) eller GHS- (3) klassificeringssystemerne. Når stoffer i visse kemiske (dvs. alkoholer, ketoner) eller fysiske (dvs. faste stoffer) stofgrupper udelukkes fra databasen, ligger nøjagtigheden af BCOP på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne fra 87 % (72/83) til 92 % (78/85), falsk positiv-raterne ligger fra 12 % (7/58) til 16 % (9/56), og falsk negativ-raterne ligger fra 0 % (0/27) til 12 % (3/26).

45. Selv hvis der ikke opnås en klassificering som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof for et teststof, kan BCOP-dataene være nyttige sammen med testdata fra *in vivo*-kaninøjentesten eller fra en tilstrækkeligt valideret *in vitro*-test til yderligere vurdering af anvendeligheden af og begrænsningerne for BCOP-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (et Guidance Document om anvendelse af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder er under udarbejdelse).

**Undersøgelsesacceptkriterier**

46. En test betragtes som acceptabel, hvis den positive kontrol giver en IVIS, der er inden for to standardafvigelser fra det aktuelle historiske gennemsnit, som skal ajourføres mindst hver tredje måned eller hver gang, der gennemføres en acceptabel test på laboratorier, hvor der sjældent gennemføres test (dvs. sjældnere end en gang om måneden). Negative eller opløsningsmiddel/vehikel-kontrolresponser skal resultere i uklarheds- og permeabilitetsværdier, der er mindre end de fastsatte øvre grænser for baggrundsuklarheds- og -permeabilitetsværdier for oksecorneae behandlet med den respektive negative kontrol eller opløsningsmiddel/vehikel-kontrol.

**Testrapport**

47. Testrapporten skal omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

*Test- og kontrolstoffer*

Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes;

CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes;

renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige;

fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemisk stofgruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse;

behandling af test/kontrol-stofferne inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling);

stabilitet, hvis den kendes.

▼M2

*Oplysninger om sponsoren og testfaciliteten*

Navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen;

identifikation af kilden til øjnene (dvs. den facilitet, hvor de er indsamlet);

opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval inden påbegyndelse af testning, transportmedier og temperaturbetingelser, eventuelle anvendte antibiotika);

særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. donordyrenes alder, køn, vægt), hvis de er tilgængelige.

*Begrundelse for den anvendte testmetode og protokol*

*Testmetodeintegritet*

Den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af testmetoden over tid (f.eks. periodisk testning af kompetencestoffer, anvendelse af historiske negative og positive kontroldata).

*Kriterier for en acceptabel test*

Acceptable samtidige positive og negative kontrolintervaller på grundlag af historiske data;

acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

*Testbetingelser*

Beskrivelse af det anvendte testsystem;

den anvendte corneaholdertype;

kalibreringsoplysninger for udstyr anvendt til måling af uklarhed og permeabilitet (f.eks. opacitometer og spektrofotometer);

oplysninger om de anvendte oksecorneae, herunder specifikation af deres kvalitet;

detaljer om den anvendte testprocedure;

anvendt(e) teststofkoncentration(er);

beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren;

reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, kompetencestoffer, referencestoffer);

beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier.

*Resultater*

Angivelse i tabelform af data fra hver enkelt testprøve (f.eks. uklarheds- og $OD_{490}$-værdier og beregnet IVIS for teststoffet og de positive kontroller, negative kontroller og referencekontrollerne [hvis de er medtaget] rapporteret i tabelform, herunder data fra flergangsbestemmelser/gentagne bestemmelser, hvis det er relevant, og gennemsnit ± standardafvigelsen for hvert forsøg);

beskrivelse af andre observerede virkninger.

*Diskussion af resultaterne*

*Konklusion*

LITTERATUR

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼M2

(2) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EØS-relevant tekst). EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Se følgende websted:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Erklæring om konklusionen på den retrospektive ICCVAM-undersøgelse af organotypiske *in vitro*-assays som screeningstest til identifikation af potentielle øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer). Se følgende websted:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(6) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Se følgende websted:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(9) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italien: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼**M2**

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Se følgende websted:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.

(17) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(18) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼**M2**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Cornea:** Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

**Corneapermeabilitet:** Kvantitativ måling af beskadigelsen af cornea-epitelet ud fra bestemmelse af mængden af farvestoffet natriumfluorescein, der trænger gennem alle corneacellelag.

**Cornea-uklarhed:** Måling af graden af cornea-uigennemsigtighed efter eksponering for et teststof. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea. Uklarhed kan vurderes subjektivt som i Draize-kaninøjentesten eller objektivt med et instrument, såsom et »opacitometer«.

**EPA-kategori I:** Ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller corneabeskadigelse eller -irritation, som persisterer mere end 21 dage (1).

**EU-kategori R41:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (2).

**Falsk negativ-rate:** Den andel af alle positive stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Falsk positiv-rate:** Den andel af alle negative stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier]):** Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer, såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om stoffernes og blandingernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (3).

▼M2

**GHS-kategori 1:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (3).

**Ikke-irriterende stof:** Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B.

***In vitro*-irritationsscore (IVIS):** En empirisk udledt formel, som anvendes i BCOP-assayet, og hvorved den gennemsnitlige uklarhedsværdi og den gennemsnitlige permeabilitetsværdi for hver behandlingsgruppe kombineres i en enkelt *in vitro*-score for hver behandlingsgruppe. *IVIS* = gennemsnitlig uklarhedsværdi + (15 x gennemsnitlig permeabilitetsværdi).

**Negativ kontrol:** Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem. Denne prøve behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastslå, om opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

**Nøjagtighed:** Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans« forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til.

**Opacitometer:** Et instrument, som anvendes til at måle »cornea-uklarhed« ved kvantitativ vurdering af lystransmission gennem cornea. Det typiske instrument har to rum, som hver har sin egen lyskilde og fotocelle. Det ene rum anvendes til den behandlede cornea, mens det andet anvendes til at kalibrere og nulstille instrumentet. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolrum (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgsrummet, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display.

**Opløsningsmiddel/vehikel-kontrol:** En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller vehiklet, og som behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med teststoffet opløst i det samme opløsningsmiddel eller vehikel. Ved test sammen med en samtidig negativ kontrol påviser denne prøve også, hvorvidt opløsningsmidlet eller vehiklet interagerer med testsystemet.

**Positiv kontrol:** Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons ikke være overdrevent stor.

**Potentiel fare:** Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

**Pålidelighed:** Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarheden inden for og mellem laboratorier og repeterbarheden inden for laboratorier.

**Referencestof:** Et stof, som anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; (iii) kendte fysiske/kemiske egenskaber; (iv) støttedata om kendte virkninger og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

**Stærkt øjenirriterende stof:** (a) Et stof, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade, som ikke er forsvundet inden for 21 dage efter applikation, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

▼M2

**Trindelt testning:** Ved anvendelse af den trindelte testningsstrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et teststof i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en »weight of evidence«-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et teststofs irritationspotentiale kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, er der ikke behov for yderligere testning. Hvis et teststofs irritationspotentiale ikke kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, udføres en trinvis sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

**Valideret testmetode:** En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

**»Weight of evidence«:** En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

**Øjenirriterende stof:** (a) Et stof, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Øjenætsende stof:** (a) Et stof, som forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

▼M2

*Tillæg 2*

**Kompetencestoffer til BCOP-testmetoden**

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en testmetode, der følger denne testmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsnings-klassificeringen for de ti anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjen-irritation/ætsning, som er baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (TG 405) (dvs. stoffer, der i henhold til UN GHS er i kategori 1, 2A, 2B eller ikke er klassificeret og mærket) (3) (7). Hvad angår den validerede anvendelighed af disse assays (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige *in vivo*-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for de to *in vitro*-metoder, for hvilke der er Test Guidelines under udarbejdelse. Derfor blev irriterende stoffer udvalgt fra den af ICCVAM anbefalede liste over 122 referencestoffer til validering af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder (se Appendix H, ICCVAM Recommended Reference Substances List) (5). Referencedata findes i ICCVAM Background Review Documents for BCOP-testmetoden og isoleret kyllingeøje-testmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-testmetoden) (17) (18).

*Tabel 1*

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af BCOP

| Stof | CASRN | Kemisk stof-gruppe ([1]) | Fysisk form | *In vivo*-klassificering ([2]) | *In vitro*-klassificering ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkoniumchlorid (5 %) | 8001-54-5 | Oniumforbindelse | Flydende | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Chlorhexidin | 55-56-1 | Amin, amidin | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Dibenzoyl-L-vinsyre | 2743-38-6 | Carboxylsyre, ester | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Imidazol | 288-32-4 | Heterocyklisk | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Trichloreddikesyre (30 %) | 76-03-9 | Carboxylsyre | Flydende | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| 2,6-dichlorbenzoyl- chlorid | 4659-45-4 | Acylhalogenid | Flydende | Kategori 2A | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| Ethyl-2-methylaceto-acetat | 609-14-3 | Keton, ester | Flydende | Kategori 2B | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| Ammoniumnitrat | 6484-52-2 | Uorganisk salt | Fast | Kategori 2A | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |

▼**M2**

| Stof | CASRN | Kemisk stof-gruppe (1) | Fysisk form | *In vivo*-klassificering (2) | *In vitro*-klassificering (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glycerol | 56-81-5 | Alkohol | Flydende | Ikke mærket | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| n-hexan | 110-54-3 | Carbonhydrid (acyklisk) | Flydende | Ikke mærket | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) De kemiske stofgrupper for hvert teststof blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (3) (7).

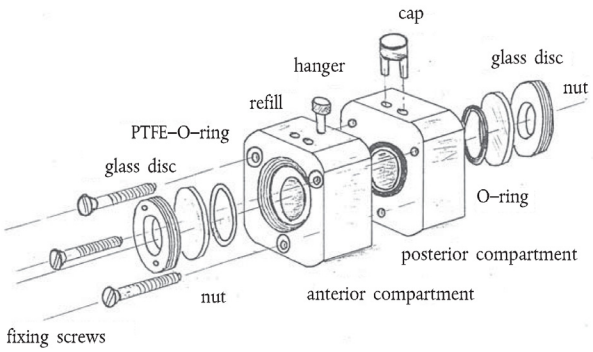
(3) Baseret på resultater fra BCOP og ICE.

▼**M2**

*Tillæg 3*

BCOP-CORNEAHOLDEREN

1. BCOP-corneaholderne er fremstillet af et inaktivt materiale (f.eks. polypropylen). Holderne består af to halvdele (et forreste og et bageste kammer) og har to ens cylindriske indre kamre. Hvert kammer kan rumme et volumen på 5 ml og er afgrænset af et glasvindue, gennem hvilket der foretages uklarhedsmålinger. Hvert indre kammer har en diameter på 1,7 cm og en dybde på 2,2 cm ([1]). Der er anbragt en o-ring på det bageste kammer for at forhindre lækager. Corneae anbringes med endotelsiden nedad på de bageste kamres o-ring, og de forreste kamre anbringes på epitelsiden af corneae. Kamrene holdes på plads med tre rustfri skruer, som er placeret på de udvendige kammerkanter. Der er placeret et glasvindue for enden af hvert kammer, som kan fjernes, så der er let adgang til cornea. Der er også anbragt en o-ring mellem glasvinduet og kammeret for at forhindre lækager. To huller på hvert kammers overside muliggør tilførsel og fjernelse af medium og testforbindelser. De er lukket med gummihætter i behandlings- og inkuberingsperioderne.




*Ordforklaring*

Glass disc: Glasplade

PTFE-O-ring: PTFE-O-ring

Refill: Påfyldning

Hanger: Ophæng

Cap: Hætte

Nut: Møtrik

O-ring: O-ring

Posterior compartment: Bageste kammer

Anterior compartment: Forreste kammer

Fixing screws: Fastgørelsesskruer

([1]) De angivne dimensioner gælder for en corneaholder, som anvendes til køer i alderen fra 12 til 60 måneder. Hvis der anvendes dyr i alderen fra 6 til 12 måneder, vil holderen i stedet skulle konstrueres sådan, at hvert kammer kan rumme et volumen på 4 ml, og hvert af de indre kamre har en diameter på 1,5 cm og en dybde på 2,2 cm. For enhver nykonstrueret corneaholder er det meget væsentligt, at forholdet mellem det eksponerede corneaoverfladeareal og det bageste kammers volumen er det samme som forholdet i den traditionelle corneaholder. Det er nødvendigt for at sikre, at permeabilitetsværdierne bestemmes korrekt til beregning af IVIS ved hjælp af den foreslåede formel.

▼**M2**

OPACITOMETERET

2. Opacitometeret er en anordning til måling af lystransmission. Lys fra en halogenlampe sendes gennem et kontrolrum (et væsketomt kammer uden vinduer) til en fotocelle og sammenlignes med det lys, som er sendt gennem forsøgsrummet, som rummer kammeret med cornea, til en fotocelle. Forskellen i lystransmission fra fotocellerne sammenlignes, og der vises en numerisk uklarhedsværdi på et digitalt display. Uklarhedsenhederne fastlægges.

3. Opacitometeret skal give en lineær respons for en række uklarhedsaflæsninger, som omfatter de til de forskellige klassificeringer anvendte tærskelværdier, som er beskrevet med den anvendte Prediction Model (dvs. op til den tærskelværdi, som er bestemmende for klassificering som ætsning/stærk irritation). For at sikre lineære og nøjagtige aflæsninger op til 75-80 uklarhedsenheder er det nødvendigt at kalibrere opacitometeret ved hjælp af en række kalibratorer. Kalibratorerne (uigennemsigtige polyesterark) anbringes i kalibreringskammeret (et corneakammer, som er konstrueret til at rumme kalibratorerne), hvorefter opacitometeret aflæses. Kalibreringskammeret er konstrueret til at rumme kalibratorerne i ca. samme position mellem lyset og fotocellen, som corneae vil blive anbragt i under uklarhedsmålingerne. Opacitometeret kalibreres først til 0 uklarhedsenheder ved anvendelse af kalibreringskammeret uden isat kalibrator. Derpå anbringes tre forskellige kalibratorer en efter en i kalibreringskammeret, og uklarhederne måles. Kalibrator 1, 2 og 3 skal give uklarhedsaflæsninger svarende til deres forud fastsatte værdier på henholdsvis 75, 150 og 225 uklarhedsenheder ± 5 %.

▼M2

## B.48. ISOLERET KYLLINGEØJE-TESTMETODEN (ICE-TESTMETODEN) TIL IDENTIFIKATION AF ØJENÆTSENDE STOFFER OG STÆRKT ØJENIRRITERENDE STOFFER

INDLEDNING

1. Isoleret kyllingeøje-testmetoden (ICE [Isolated Chicken Eye]-testmetoden) er en *in vitro*-testmetode, som under visse omstændigheder og med særlige begrænsninger kan anvendes til at klassificere stoffer og blandinger som »øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer« (1) (2) (3). I denne testmetode er stærkt irriterende stoffer defineret som dem, der inducerer øjenlæsioner, der persisterer hos kaninen i mindst 21 dage efter administration. Selv om den ikke betragtes som gyldig som fuldstændig erstatning for *in vivo*-kaninøjentesten, anbefales ICE anvendt som del af en trindelt testningsstrategi for forskriftsmæssig klassificering og mærkning inden for et specifikt anvendelsesområde (domæne) (4) (5). Teststoffer og -blandinger (6), som er positive i dette assay, kan klassificeres som øjenætsende stoffer eller stærkt øjenirriterende stoffer uden yderligere testning hos kaniner. Et stof, der er testet negativt, vil skulle testes hos kaniner ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi som anført i OECD Test Guideline 405 (7) (kapitel B. 5 i dette bilag).

2. Formålet med denne testmetode er at beskrive de procedurer, som anvendes til at vurdere et teststofs potentielle øjenætsning eller stærke øjenirritation som målt ved dets evne til at inducere toksicitet i et enukleeret kyllingeøje. Toksiske virkninger på cornea måles ved (i) en kvalitativ vurdering af uklarhed, (ii) en kvalitativ vurdering af epitelbeskadigelse på grundlag af applikation af fluorescein på øjet (fluoresceinretention), (iii) en kvantitativ måling af øget tykkelse (opsvulmning) og (iv) en kvalitativ vurdering af makroskopisk morfologisk overfladebeskadigelse. Vurderingerne af cornea-uklarhed, -opsvulmning og -beskadigelse efter eksponering for et teststof evalueres individuelt, hvorefter de kombineres til udledning af en Eye Irritancy Classification (øjenirritationsklassificering).

3. Øjenirriterende stoffer, som inducerer læsioner, der forsvinder på mindre end 21 dage, og ikke-øjenirriterende stoffer er også testet ved anvendelse af ICE-testmetoden. ICE-testmetodens nøjagtighed og pålidelighed for stoffer i disse kategorier er imidlertid ikke vurderet formelt.

4. Definitioner findes i tillæg 1.

INDLEDENDE BETRAGTNINGER OG BEGRÆNSNINGER

5. Denne testmetode er baseret på Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) ICE Test Method Protocol (8), som blev udviklet efter en international valideringsundersøgelse (4) (5) (9) med bidrag fra European Centre for the Validation of Alternative Methods, Japanese Center for the Validation of Alternative Methods og TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology (Nederlandene). Protokollen er baseret på oplysninger fra offentliggjorte protokoller, såvel som TNO's aktuelt anvendte protokol (10) (11) (12) (13) (14).

▼**M2**

6. De identificerede begrænsninger for denne metode er baseret på falsk positiv-raten for alkoholer og falsk negativ-raterne for faste stoffer og overfladeaktive stoffer (se punkt 47) (4). Når stoffer i disse kemiske og fysiske stofgrupper udelukkes fra databasen, forbedres ICE's nøjagtighed på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne væsentligt (4). Som følge af formålet med dette assay (dvs. alene identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer) er falsk negativ-rater ikke kritiske, eftersom sådanne stoffer efterfølgende vil blive testet hos kaniner eller med andre tilstrækkeligt validerede *in vitro*-test, alt efter de forskriftsmæssige krav, ved anvendelse af en sekventiel testningsstrategi med en »weight of evidence«-tilgang. Den nuværende valideringsdatabase har desuden ikke muliggjort en tilstrækkelig vurdering af visse kemiske stofgrupper eller produktgrupper (f.eks. blandinger). Undersøgerne vil imidlertid kunne overveje at anvende denne testmetode til test af alle materialetyper (herunder blandinger), hvor et positivt resultat vil kunne accepteres som indikativt for en øjenætsningsrespons eller svær øjenirritationsrespons. Positive resultater for alkoholer skal dog fortolkes med forsigtighed som følge af risikoen for overfortolkning.

7. Alle procedurer med kyllingeøjne skal følge testfacilitetens gældende forskrifter og procedurer for håndtering af humane eller animalske materialer, hvilket omfatter, men ikke er begrænset til, væv og vævsvæsker. Det anbefales at benytte universale laboratorieforsigtighedsregler (15).

8. Testmetoden har den begrænsning, at selv om den tager højde for nogle af de øjenvirkninger, som vurderes i kaninøjenirritationstestmetoden, og til en vis grad deres sværhedsgrad, tager den ikke højde for conjunctiva- og irisskader. Desuden kan reversibiliteten af cornealæsioner ikke vurderes i sig selv med ICE-testmetoden, men det er på grundlag af kaninøjenundersøgelser foreslået, at en vurdering af den indledende cornealæsionsdybde kan anvendes til at skelne mellem irreversible og reversible virkninger (16). Endelig muliggør ICE-testmetoden ikke vurdering af den potentielle systemiske toksicitet i forbindelse med øjeneksponering.

9. Der er bestræbelser i gang for yderligere at karakterisere anvendeligheden af og begrænsningerne for ICE-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (se også punkt 48). Brugerne opfordres også til at forsyne valideringsorganisationer med prøver og/eller data med henblik på formel vurdering af mulige fremtidige anvendelser af ICE-testmetoden, herunder anvendelse til identifikation af ikke-stærkt øjenirriterende stoffer og ikke-øjenirriterende stoffer.

10. Ethvert laboratorium bør, når det påbegynder brug af dette assay, benytte kompetencekemikalierne i tillæg 2. Et laboratorium kan benytte disse kemikalier til at godtgøre sin tekniske kompetence vedrørende brug af ICE-testmetoden, inden det påbegynder fremsendelse af ICE-data med henblik på forskriftsmæssig fareklassificering.

PRINCIP FOR TESTMETODEN

11. ICE-testmetoden er en organotypisk model, som kortvarigt opretholder kyllingeøjets funktion *in vitro*. Ved denne testmetode vurderes teststoffets beskadigende virkning ved bestemmelse af cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention. Mens de to sidstnævnte parametre indebærer en kvalitativ vurdering, medfører analyse af cornea-opsvulmning, at der skal foretages en kvantitativ vurdering. Hver måling konverteres enten til en kvantitativ score, som anvendes til beregning af et samlet Irritation Index (irritationsindeks), eller tildeles en kvalitativ kategorisering, som anvendes til at tildele en *in vitro*-klassificering med hensyn til øjenætsning og stærk øjenirritation. Begge disse udfald kan derpå anvendes til at forudsige et teststofs *in vivo*-potentiale for øjenætsning og stærk øjenirritation (se Beslutningskriterier).

▼M2

**Kilde til kyllingeøjne og deres alder**

12. Historisk set er der til dette assay anvendt øjne indsamlet fra kyllinger på et slagteri, hvor de aflives med henblik på anvendelse til konsum, hvilket eliminerer behovet for forsøgsdyr. Kun øjnene fra raske dyr, som anses for egnede til at indgå i menneskets fødekæde, anvendes.

13. Selv om der ikke er gennemført en kontrolleret undersøgelse til vurdering af den optimale kyllingealder, har de ved denne testmetode anvendte kyllinger historisk set haft samme alder og vægt som de på et fjerkræslagteri traditionelt behandlede vårkyllinger (dvs. ca. 7 uger gamle kyllinger med en vægt på 1,5-2,5 kg).

**Indsamling og transport af øjne til laboratoriet**

14. Hovederne skal fjernes umiddelbart efter sedering af kyllingerne, som sædvanligvis sker ved elektrisk stød, og incision i halsen med henblik på afblødning. Der skal findes en lokal kilde til kyllinger tæt på laboratoriet, således at deres hoveder kan overføres fra slagteriet til laboratoriet hurtigt nok til, at ødelæggelse og/eller bakteriekontaminering minimeres. Tidsintervallet mellem indsamlingen af kyllingehovederne og anvendelsen af øjnene ved ICE-testmetoden skal minimeres (det skal typisk være to timer eller derunder), og det skal påvises, at intervallets varighed ikke påvirker assayresultaterne negativt. Disse resultater er baseret på udvælgelseskriterierne for øjnene såvel som de positive og negative kontrolresponser. Alle de øjne, som anvendes i assayet, skal stamme fra samme gruppe øjne, som er indsamlet på en bestemt dag.

15. Eftersom øjnene fridissekeres i laboratoriet, transporteres de intakte hoveder fra slagteriet ved omgivende temperatur i plastkasser befugtet med håndklæder, som er vædet med isotonisk saltvand.

**Udvælgelseskriterier for øjne, der anvendes i ICE-testen**

16. Øjne med højt niveau af basislinjefluoresceinfarvning (dvs. > 0,5) eller høj cornea-uklarhedsscore (dvs. > 0,5) efter enukleering kasseres.

17. Hver behandlingsgruppe og samtidige positive kontrol består af mindst tre øjne. Den negative kontrolgruppe eller opløsningsmiddelkontrollen (hvis der anvendes et andet opløsningsmiddel end saltvand) består af mindst ét øje.

TESTPROCEDURE

**Klargøring af øjnene**

18. Øjenlågene ekscideres forsigtigt og uden at beskadige cornea. Der foretages en hurtig vurdering af cornea-integriteten ved at påføre en dråbe 2 % (vægt/volumen) natriumfluorescein på cornea-overfladen i nogle få sekunder, hvorefter der skylles med isotonisk saltvand. De fluoresceinbehandlede øjne undersøges derefter med et spaltelampemikroskop for at sikre, at cornea er ubeskadiget (dvs. har scorer for fluoresceinretention og cornea-uklarhed ≤ 0,5).

19. Er cornea ubeskadiget, fridissekeres øjet helt fra kraniet uden at beskadige cornea. Øjeæblet trækkes ud af øjenhulen ved et fast tag i blinkhinden med en kirurgisk tang, og øjenmusklerne skæres over med en bøjet, stumpendet saks. Det er vigtigt at undgå corneabeskadigelse som følge af overdrevent tryk (dvs. komprimeringsartefakter).

20. Når øjet fjernes fra øjenhulen, skal der medfølge en synlig vedhængende del af synsnerven. Efter fjernelsen fra øjenhulen anbringes øjet på et absorberende underlag, hvorefter blinkhinden og andet bindevæv skæres væk.

▼M2

21. Det enukleerede øje anbringes i en rustfri stålholder med cornea i lodret position. Derefter indsættes holderen i et kammer i superfusionsapparatet (16). Holderne skal anbringes sådan i superfusionsapparatet, at det isotoniske saltvand drypper ned over hele cornea. Temperaturen i superfusionsapparatets kamre skal være reguleret til 32 ± 1,5 °C. Tillæg 3 indeholder et diagram over et typisk superfusionsapparat og øjenholderne, som kan købes i handelen eller konstrueres. Apparatet kan modificeres, så det opfylder det enkelte laboratoriums behov (f.eks. så det kan rumme et andet antal øjne).

22. Efter anbringelsen i superfusionsapparatet undersøges øjnene igen med et spaltelampemikroskop for at sikre, at de ikke er blevet beskadiget under dissektionsproceduren. På dette tidspunkt måles også corneatykkelsen. Den måles ved corneas toppunkt ved anvendelse af dybdemålingsanordningen på spaltelampemikroskopet. Øjne med (i) en fluoresceinretentionsscore på > 0,5; (ii) en cornea-uklarhed på > 0,5 eller (iii) eventuelle yderligere tegn på beskadigelse skal udskiftes. Af de øjne, der ikke kasseres ud fra nogen af ovennævnte kriterier, kasseres øjne med en corneatykkelse, som afviger mere end 10 % fra gennemsnitsværdien for alle øjne. Brugerne skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden. Spaltebredden skal indstilles til 0,095 mm.

23. Når alle øjnene er undersøgt og godkendt, inkuberes de i ca. 45 til 60 minutter for at bringe dem i ligevægt med testsystemet inden dosering. Efter ligevægtsindstillingsperioden foretages en nulpunktsreferencemåling af corneatykkelse og -uklarhed, som vil fungere som basislinje (dvs. tid = 0). Den ved fridissekering bestemte fluoresceinscore anvendes som basislinjemåling for det endepunkt.

**Applikation af teststoffet**

24. Umiddelbart efter nulpunktsreferencemålingerne fjernes øjet (i sin holder) fra superfusionsapparatet og anbringes i vandret position, hvorefter teststoffet påføres på cornea.

25. Flydende teststoffer testes typisk ufortyndede, men kan fortyndes, hvis det anses for nødvendigt (f.eks. som del af undersøgelsens design). Det foretrukne opløsningsmiddel til fortyndede stoffer er fysiologisk saltvand. Der kan imidlertid også anvendes alternative opløsningsmidler under kontrollerede betingelser, men egnetheden af andre opløsningsmidler end fysiologisk saltvand skal påvises.

26. Flydende teststoffer påføres på cornea således, at hele overfladen af cornea dækkes jævnt med teststoffet. Standardvolumenet er 0,03 ml.

27. Om muligt bør faste stoffer formales så fint som muligt med morter og støder eller et tilsvarende formalingsværktøj. Pulveret påføres på cornea således, at overfladen dækkes jævnt med teststoffet. Standardmængden er 0,03 g.

28. Når teststoffet (flydende eller fast) har været påført i 10 sekunder, skylles det væk fra øjet med isotonisk saltvand (ca. 20 ml) ved omgivende temperatur. Øjet (i sin holder) sættes derefter tilbage i superfusionsapparatet i sin oprindelige opretstående position.

**Kontrolstoffer**

29. Der skal indgå samtidige negative kontroller eller opløsningsmiddel/vehikel-kontroller og positive kontroller i hvert forsøg.

▼M2

30. Ved test af væsker i en koncentration på 100 % eller faste stoffer anvendes fysiologisk saltvand som den samtidige negative kontrol ved ICE-testmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons.

31. Ved test af fortyndede væsker medtages en samtidig opløsningsmiddel/vehikel-kontrolgruppe ved testmetoden, således at ikke-specifikke ændringer i testsystemet kan påvises, og det kan sikres, at assaybetingelserne ikke fejlagtigt resulterer i en irritationsrespons. Som anført i punkt 25 kan der kun anvendes et opløsningsmiddel/vehikel, som er påvist ikke at påvirke testsystemet negativt.

32. Der medtages et kendt øjenirriterende stof som samtidig positiv kontrol i hvert forsøg for at verificere, at der induceres en passende respons. Eftersom ICE-assayet anvendes i denne testmetode til identifikation af ætsende eller stærkt irriterende stoffer, skal den positive kontrol være et referencestof, som inducerer en svær respons ved denne testmetode. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons imidlertid ikke være overdrevent stor. Der skal genereres tilstrækkelige *in vitro*-data for den positive kontrol, således at der kan beregnes et statistisk defineret acceptabelt interval for den positive kontrol. Hvis der ikke er tilstrækkelige historiske ICE-testmetodedata tilgængelige for en bestemt positiv kontrol, kan det være nødvendigt at gennemføre undersøgelser for at tilvejebringe disse oplysninger.

33. Eksempler på positive kontroller for flydende teststoffer er 10 % eddikesyre eller 5 % benzalkoniumchlorid, mens eksempler på positive kontroller for faste teststoffer er natriumhydroxid eller imidazol.

34. Referencestoffer er nyttige i forbindelse med vurdering af øjenirritationspotentialet for ukendte kemikalier fra en særlig kemisk stofgruppe eller produktgruppe eller vurdering af det relative irritationspotentiale for et øjenirriterende stof inden for et specifikt område af irritationsresponser.

**Målte endepunkter**

35. Behandlede corneae vurderes inden behandlingen og fra og med 30, 75, 120, 180 og 240 minutter (± 5 minutter) efter skylningen efter behandlingen. Med disse tidspunkter opnås et passende antal målinger over firetimers behandlingsperioden, samtidig med at der er tilstrækkelig tid mellem målingerne til at foretage de fornødne observationer for alle øjnene.

36. De vurderede endepunkter er cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention og morfologiske virkninger på cornea (f.eks. erosion eller løsning af epitelet). Alle endepunkterne med undtagelse af fluoresceinretention (som kun bestemmes inden behandlingen og 30 minutter efter teststofeksponeringen) bestemmes på hvert af de ovennævnte tidspunkter.

37. Det tilrådes at tage fotografier for at dokumentere cornea-uklarhed og -fluoresceinretention, morfologiske virkninger på cornea og, hvis det udføres, histopatologi.

38. Efter den afsluttende undersøgelse efter fire timer opfordres brugerne til at konservere øjnene i et egnet fikseringsmiddel (f.eks. neutralbufret formalin) med henblik på eventuel histopatologisk undersøgelse.

▼**M2**

39. Cornea-opsvulmning bestemmes ud fra corneatykkelsesmålinger foretaget med et optisk pachymeter på et spaltelampemikroskop. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved hjælp af følgende formel:

$$\left[\frac{\textit{cornea tykkelse til tiden } t \; - \; \textit{cornea tykkelse til tiden } = 0}{\textit{cornea tykkelse til tide } = 0}\right] \times 100$$

40. Den gennemsnitlige procentvise cornea-opsvulmning for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-opsvulmning som observeret på et hvilket som helst tidspunkt opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert teststof.

41. Beregningen af cornea-uklarhed baseres på scoring af det område af cornea, hvor uklarheden er mest udtalt. Den gennemsnitlige cornea-uklarhedsværdi for alle testøjnene beregnes for alle observationstidspunkter. Ud fra den højeste gennemsnitsscore for cornea-uklarhed som observeret på et hvilket som helst tidspunkt opnås der derefter en samlet kategoriscore for hvert teststof (tabel 1).

*Tabel 1*

Cornea-uklarhedsscorer

| Score | Observation |
|---|---|
| 0 | Ingen uklarhed |
| 0,5 | Meget ubetydelig uklarhed |
| 1 | Spredte eller diffuse områder; detaljer i iris ses tydeligt |
| 2 | Let skelneligt gennemskinneligt område; detaljer i iris er lidt utydelige |
| 3 | Stærk cornea-uklarhed; ingen specifikke detaljer i iris er synlige; pupillens størrelse er kun lige akkurat skelnelig |
| 4 | Fuldstændig cornea-uklarhed; iris er ikke synlig |

42. Den gennemsnitlige fluoresceinretentionsværdi for alle testøjnene beregnes kun for 30-minutters observationstidspunktet, og herudfra opnås den samlede kategoriscore for hvert teststof (tabel 2).

*Tabel 2*

Fluoresceinretentionsscorer

| Score | Observation |
|---|---|
| 0 | Ingen fluoresceinretention |
| 0,5 | Meget ubetydelig enkeltcellefarvning |
| 1 | Enkeltcellefarvning spredt ud over hele det behandlede område af cornea |
| 2 | Fokal eller sammenflydende enkeltcellefarvning med høj tæthed |
| 3 | Fluorescein er tilbageholdt i store sammenflydende områder af cornea |

▼M2

43. Morfologiske virkninger omfatter »erosion« af cornea-epitelceller, »løsning« af epitelet, »tiltagende ruhed« af cornea-overfladen og »fastklæben« af teststoffet til cornea. Disse resultater kan have varierende sværhedsgrad og kan forekomme samtidig. Klassificeringen af disse resultater er subjektiv og baseret på undersøgerens fortolkning.

DATA OG RAPPORTERING

**Datavurdering**

44. Resultaterne for cornea-uklarhed, -opsvulmning og -fluoresceinretention skal vurderes særskilt for at finde frem til en ICE-stofgruppe for hvert endepunkt. Derefter kombineres ICE-stofgrupperne for hvert endepunkt for at opnå en Irritancy Classification (irritationsklassificering) for hvert teststof.

**Beslutningskriterier**

45. Når hvert af endepunkterne er vurderet, kan der fastsættes ICE-stofgrupper på grundlag af forudfastsatte intervaller. Fortolkning af corneatykkelse (tabel 3), -uklarhed (tabel 4) og -fluoresceinretention (tabel 5) ved anvendelse af fire ICE-stofgrupper udføres ud fra følgende skalaer:

*Tabel 3*

ICE-klassificeringskriterier for corneatykkelse

| Gennemsnitlig cornea-opsvulmning (%) (*) | ICE-stofgruppe |
|---|---|
| 0-5 | I |
| > 5-12 | II |
| > 12-18 (> 75 min efter behandling) | II |
| > 12-18 (≤ 75 min efter behandling) | III |
| > 18-26 | III |
| > 26-32 (> 75 min efter behandling) | III |
| > 26-32 (≤ 75 min efter behandling) | IV |
| > 32 | IV |

(*) Cornea-opsvulmningsscorerne gælder kun, hvis tykkelsen er målt med et Haag-Streit BP900-spaltelampemikroskop med dybdemålingsanordning nr. I og indstilling af spaltebredden til 9½, som svarer til 0,095 mm. Brugerne skal være opmærksomme på, at spaltelampemikroskoper kan give forskellige corneatykkelsesmålinger alt efter indstillingen af spaltebredden.

*Tabel 4*

ICE-klassificeringskriterier for uklarhed

| Gennemsnitlig maksimal uklarhedsscore (*) | ICE-stofgruppe |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-4,0 | IV |

(*) Se tabel 1.

▼**M2**

*Tabel 5*

ICE-klassificeringskriterier for gennemsnitlig fluoresceinretention

| Gennemsnitlig fluoresceinreten-tionsscore 30 minutter efter behandling (*) | ICE-stofgruppe |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-3,0 | IV |

(*) Se tabel 2.

46. Den samlede *in vitro*-irritationsklassificering for et teststof fastsættes ved at aflæse den irritationsklassificering, der svarer til kombinationen af kategorier opnået for cornea-opsvulmning, -uklarhed og -fluoresceinretention, og gå ud fra oversigten i tabel 6.

*Tabel 6*

Samlede *in vitro*-irritationsklassificeringer

| Klassificering | Kombinationer af de 3 endepunkter |
|---|---|
| Ætsende stof/Stærkt irriterende stof | 3 × IV<br>2 × IV, 1 × III<br>2 × IV, 1 × II (*)<br>2 × IV, 1 × I (*)<br>Cornea-uklarhed ≥ 3 efter 30 min (for mindst 2 øjne)<br>Cornea-uklarhed = 4 på et hvilket som helst tidspunkt (for mindst 2 øjne)<br>Markant løsning af epitelet (for mindst 1 øje) |

(*) Disse kombinationer er mindre sandsynlige.

47. Som anført i punkt 1 skal der, hvis teststoffet ikke identificeres som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof, gennemføres yderligere testning med henblik på klassificering og mærkning. ICE-testmetoden har en generel nøjagtighed på 83 % (120/144) til 87 % (134/154), en falsk positiv-rate på 6 % (7/122) til 8 % (9/116) og en falsk negativ-rate på 41 % (13/32) til 50 % (15/30) til identifikation af øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer i sammenligning med *in vivo*-kaninøjentestmetodedata klassificeret i henhold til EPA- (1), EU- (2) eller GHS- (3) klassificeringssystemerne. Når stoffer i visse kemiske (dvs. alkoholer og overfladeaktive stoffer) og fysiske (dvs. faste stoffer) stofgrupper udelukkes fra databasen, ligger nøjagtigheden af ICE på tværs af EU-, EPA- og GHS-klassificeringssystemerne fra 91 % (75/82) til 92 % (69/75), falsk positiv-raterne ligger fra 5 % (4/73) til 6 % (4/70), og falsk negativ-raterne ligger fra 29 % (2/7) til 33 % (3/9) (4).

48. Selv hvis der ikke opnås en klassificering som øjenætsende stof eller stærkt øjenirriterende stof for et teststof, kan ICE-dataene være nyttige sammen med testdata fra *in vivo*-kaninøjentesten eller fra en tilstrækkeligt valideret *in vitro*-test til yderligere vurdering af anvendeligheden af og begrænsningerne for ICE-testmetoden til identifikation af ikke-stærkt irriterende stoffer og ikke-irriterende stoffer (et Guidance Document om anvendelse af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder er under udarbejdelse).

▼M2

**Undersøgelsesacceptkriterier**

49. En test betragtes som acceptabel, hvis de samtidige negative kontroller eller vehikel/opløsningsmiddel-kontroller og de samtidige positive kontroller giver en Irritancy Classification (irritationsklassificering) inden for henholdsvis ikke-irriterende og stærkt irriterende/ætsende stofgrupper.

**Testrapport**

50. Testrapporten skal omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

*Test- og kontrolstoffer*

Kemisk(e) navn(e), såsom det strukturnavn, der anvendes af Chemical Abstracts Service (CAS), efterfulgt af andre navne, hvis sådanne kendes;

CAS-registreringsnummeret (RN), hvis det kendes;

renhed og sammensætning af stoffet eller blandingen (i vægtprocent) i det omfang, disse oplysninger er tilgængelige;

fysisk-kemiske egenskaber, såsom fysisk tilstand, flygtighed, pH, stabilitet, kemisk stofgruppe og vandopløselighed, som er relevante for undersøgelsens gennemførelse;

behandling af test/kontrol-stofferne inden testning, hvis det er relevant (f.eks. opvarmning, formaling);

stabilitet, hvis den kendes.

*Oplysninger om sponsoren og testfaciliteten*

Navn og adresse på sponsoren, testfaciliteten og undersøgelseslederen;

identifikation af kilden til øjnene (f.eks. den facilitet, hvor de er indsamlet);

opbevarings- og transportbetingelser for øjnene (f.eks. dato og klokkeslæt for øjenindsamling, tidsinterval inden påbegyndelse af testning);

særlige karakteristika ved de dyr, som øjnene er indsamlet fra (f.eks. donordyrenes alder, køn, vægt), hvis de er tilgængelige.

*Begrundelse for den anvendte testmetode og protokol*

*Testmetodeintegritet*

Den procedure, som anvendes til at sikre integriteten (dvs. nøjagtighed og pålidelighed) af testmetoden over tid (f.eks. periodisk testning af kompetencestoffer, anvendelse af historiske negative og positive kontroldata).

*Kriterier for en acceptabel test*

acceptable samtidige referencekontrolintervaller på grundlag af historiske data, hvis det er relevant.

*Testbetingelser*

Beskrivelse af det anvendte testsystem;

det anvendte spaltelampemikroskop (f.eks. modellen);

instrumentindstillinger for det anvendte spaltelampemikroskop;

oplysninger om de anvendte kyllingeøjne, herunder specifikation af deres kvalitet;

▼M2

detaljer om den anvendte testprocedure;

anvendt(e) teststofkoncentration(er);

beskrivelse af eventuelle ændringer i testproceduren;

reference til historiske data for modellen (f.eks. negative og positive kontroller, kompetencestoffer, referencestoffer);

beskrivelse af de anvendte vurderingskriterier.

*Resultater*

Beskrivelse af andre observerede virkninger.

Fotografier af øjnene, hvis det er relevant.

*Diskussion af resultaterne*

*Konklusion*

LITTERATUR

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(2) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006 (EØS-relevant tekst). EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

(3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York & Geneva, 2007. Se følgende websted:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Erklæring om konklusionen på den retrospektive ICCVAM-undersøgelse af organotypiske *in vitro*-assays som screeningstest til identifikation af potentielle øjenætsende stoffer og stærkt øjenirriterende stoffer). Se følgende websted:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(6) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF. EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Se følgende websted:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. I: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

(9) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Se følgende websted:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol*. 35:23-37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Se følgende websted:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) ICCVAM (2006). Background Review Document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Se følgende websted:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼M2

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Cornea:** Den transparente del af øjeæblets forside, som dækker øjets iris og pupil, og hvorigennem lys kommer ind i øjets indre.

**Cornea-opsvulmning:** En objektiv måling i ICE-testen af graden af cornea-udvidelse efter eksponering for et teststof. Den udtrykkes i procent og beregnes ud fra corneatykkelsesmålinger ved basislinje (inden dosering) og tykkelsen registreret med regelmæssige intervaller efter eksponering for testmaterialet i ICE-testen. Graden af cornea-opsvulmning er indikativ for beskadigelse af cornea.

**Cornea-uklarhed:** Måling af graden af cornea-uigennemsigtighed efter eksponering for et teststof. Øget cornea-uklarhed er indikativt for beskadigelse af cornea.

**EPA-kategori I:** Ætsende virkning (irreversibel ødelæggelse af øjenvæv) eller corneabeskadigelse eller -irritation, som persisterer mere end 21 dage (1).

**EU-kategori R41:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (2).

**Falsk negativ-rate:** Den andel af alle positive stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negative. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Falsk positiv-rate:** Den andel af alle negative stoffer, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positive. Dette er én indikator for testmetodens ydeevne.

**Fluoresceinretention:** En subjektiv måling i ICE-testen af det omfang, hvori natriumfluorescein tilbageholdes af epitelceller i cornea efter eksponering for et teststof. Graden af fluoresceinretention er indikativ for beskadigelse af cornea-epitelet.

**GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals [det globale harmoniserede system for klassificering og mærkning af kemikalier]):** Et system til klassificering af kemikalier (stoffer og blandinger) efter standardiserede typer og niveauer af fysisk fare, sundhedsfare og miljøfare med tilhørende kommunikationselementer, såsom piktogrammer, signalord, risikosætninger, sikkerhedssætninger og sikkerhedsdatablade, således at oplysninger om stoffernes og blandingernes skadelige virkninger kan videreformidles med henblik på at beskytte mennesker (f.eks. arbejdsgivere, arbejdstagere, transportører, forbrugere og redningspersonel) og miljø (3).

▼M2

**GHS-kategori 1:** Frembringelse af vævsbeskadigelse i øjet eller alvorlig fysisk synsnedsættelse, som opstår efter applikation af et teststof på øjets anteriore overflade, og som ikke er fuldt reversibel inden for 21 dage efter applikation (3).

**Ikke-irriterende stof:** Stoffer, der ikke er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori I, II eller III, EU-kategori R41 eller R36 eller GHS-kategori 1, 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Negativ kontrol:** Et ubehandlet replikat, som indeholder alle komponenter fra et testsystem. Denne prøve behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastslå, om opløsningsmidlet interagerer med testsystemet.

**Nøjagtighed:** Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af »relevans«. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til.

**Opløsningsmiddel/vehikel-kontrol:** En ubehandlet prøve, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem, herunder opløsningsmidlet eller vehiklet, og som behandles sammen med de teststofbehandlede prøver og andre kontrolprøver for at fastlægge basislinjeresponsen for de prøver, som er behandlet med teststoffet opløst i det samme opløsningsmiddel eller vehikel. Ved test sammen med en samtidig negativ kontrol påviser denne prøve også, hvorvidt opløsningsmidlet eller vehiklet interagerer med testsystemet.

**Positiv kontrol:** Et replikat, som indeholder alle komponenterne fra et testsystem og er behandlet med et stof, som vides at inducere en positiv respons. For at sikre, at det er muligt at vurdere variabiliteten i den positive kontrolrespons over tid, bør størrelsesordenen af den svære respons ikke være overdrevent stor.

**Potentiel fare:** Den iboende egenskab ved et middel eller en situation, som kan forårsage skade, når en organisme, et system eller en (sub)population eksponeres for det pågældende middel.

**Pålidelighed:** Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier og repeterbarhed inden for laboratorier.

**Referencestof:** Et stof, som anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: (i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; (ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; (iii) kendte fysiske/kemiske egenskaber; (iv) støttedata om kendte virkninger og (v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

**Spaltelampemikroskop:** Et instrument, som anvendes til direkte undersøgelse af øjet under forstørrelse tilvejebragt af et binokulært mikroskop ved frembringelse af et stereoskopisk, retvendt billede. Ved ICE-testmetoden anvendes dette instrument til at betragte de anteriore strukturer i kyllingeøjet såvel som til objektiv måling af corneatykkelse med et dybdemålingsanordningstilbehør.

**Stærkt øjenirriterende stof:** (a) Et stof, som forårsager vævsbeskadigelse i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade, som ikke er reversibel inden for 21 dage efter applikation, eller som forårsager alvorlig fysisk synsnedsættelse; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

**Trindelt testning:** Ved anvendelse af den trindelte testningsstrategi gennemgås alle eksisterende oplysninger om et teststof i en bestemt rækkefølge ved anvendelse af en »weight of evidence«-proces på hvert trin for at fastslå, om der foreligger tilstrækkelige oplysninger til at træffe en fareklassificeringsafgørelse, inden der fortsættes til næste trin. Hvis et teststofs irritationspotentiale kan fastslås på grundlag af de eksisterende oplysninger, er der ikke behov for yderligere testning. Hvis et teststofs irritationspotentiale ikke kan fastsættes på grundlag af de eksisterende oplysninger, udføres en trinvis sekventiel dyreforsøgsprocedure, indtil der kan foretages en utvetydig klassificering.

**Valideret testmetode:** En testmetode, for hvilken der er gennemført valideringsundersøgelser for at fastslå relevansen (herunder nøjagtigheden) og pålideligheden til et bestemt formål. Det er vigtigt at være opmærksom på, at en valideret testmetode måske ikke har tilstrækkelig ydeevne med hensyn til nøjagtighed og pålidelighed til at være acceptabel til det planlagte formål.

▼M2

**»Weight of evidence«:** En proces, hvor styrkerne og svaghederne ved forskellige oplysninger afvejes for at nå frem til og underbygge en konklusion om et stofs farepotentiale.

**Øjenirriterende stof:** (a) Et stof, der frembringer en reversibel ændring i øjet efter applikation på øjets anteriore overflade; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i EPA-kategori II eller III, EU-kategori R36 eller GHS-kategori 2A eller 2B (1) (2) (3).

**Øjenætsende stof:** (a) Et stof, der forårsager irreversibel vævsbeskadigelse i øjet; (b) stoffer, der er klassificeret som øjenirriterende stoffer i GHS-kategori 1, EPA-kategori I eller EU-kategori R41 (1) (2) (3).

▼M2

*Tillæg 2*

KOMPETENCEKEMIKALIER TIL ICE-TESTMETODEN

Inden laboratorier påbegynder rutinemæssig brug af en testmetode, der følger denne testmetode, bør de godtgøre deres tekniske kompetence ved korrekt identifikation af øjenætsningsklassificeringen for de ti anbefalede stoffer i tabel 1. Disse stoffer er udvalgt således, at de repræsenterer det responsområde for lokal øjen-irritation/ætsning, som er baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (TG 405) (dvs. stoffer, der i henhold til UN GHS er i kategori 1, 2A, 2B eller ikke er klassificeret og mærket) (3) (7). Hvad angår den validerede anvendelighed af disse assays (dvs. alene til identifikation af øjenætsende stoffer/stærkt øjenirriterende stoffer), er der imidlertid kun to testudfald i relation til klassificering (ætsende stof/stærkt irriterende stof eller ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof), hvormed kompetencen kan godtgøres. Andre udvælgelseskriterier var, at stofferne er kommercielt tilgængelige, at der er tilgængelige *in vivo*-referencedata af høj kvalitet, og at der findes data af høj kvalitet for de to *in vitro*-metoder, for hvilke der er Test Guidelines under udarbejdelse. Derfor blev irriterende stoffer udvalgt fra den af ICCVAM anbefalede liste over 122 referencestoffer til validering af *in vitro*-øjentoksicitetstestmetoder (se Appendix H, ICCVAM Recommended Reference Substances List) (4). Referencedata findes i ICCVAM Background Review Documents for oksecornea-uklarheds- og -permeabilitetstestmetoden (BCOP [Bovine Corneal Opacity and Permeability]-testmetoden) og ICE-testmetoden (18) (19).

*Tabel 1*

Anbefalede stoffer til godtgørelse af teknisk kompetence i anvendelse af ICE

| Kemikalium | CASRN | Kemisk stof-gruppe (1) | Fysisk form | *In vivo*-klassificering (2) | *In vitro*-klassificering (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| Benzalkonium chlorid (5 %) | 8001-54-5 | Onium forbindelse | Flydende | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Chlorhexidin | 55-56-1 | Amin, amidin | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Dibenzoyl-L-vinsyre | 2743-38-6 | Carboxylsyre, ester | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Imidazol | 288-32-4 | Heterocyklisk | Fast | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| Trichloreddike syre (30 %) | 76-03-9 | Carboxylsyre | Flydende | Kategori 1 | Ætsende stof/stærkt irriterende stof |
| 2,6-dichlor-benzoyl-chlorid | 4659-45-4 | Acylhalogenid | Flydende | Kategori 2A | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| Ethyl-2-methylaceto-acetat | 609-14-3 | Keton, ester | Flydende | Kategori 2B | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| Ammonium nitrat | 6484-52-2 | Uorganisk salt | Fast | Kategori 2A | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |

▼**M2**

| Kemikalium | CASRN | Kemisk stof-gruppe (1) | Fysisk form | *In vivo*-klassificering (2) | *In vitro*-klassificering (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| Glycerol | 56-81-5 | Alkohol | Flydende | Ikke mærket | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |
| n-hexan | 110-54-3 | Carbonhydrid (acyklisk) | Flydende | Ikke mærket | Ikke-ætsende stof/ikke-stærkt irriterende stof |

Forkortelser: CASRN = Chemical Abstracts Service Registry Number

(1) De kemiske stofgrupper for hvert teststof blev fastsat ved anvendelse af et standardklassificeringsskema baseret på National Library of Medicine Medical Subject Headings (MeSH)-klassificeringssystemet (se følgende websted: http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Baseret på resultater fra *in vivo*-kaninøjentesten (OECD TG 405) og brug af UN GHS (3) (7).

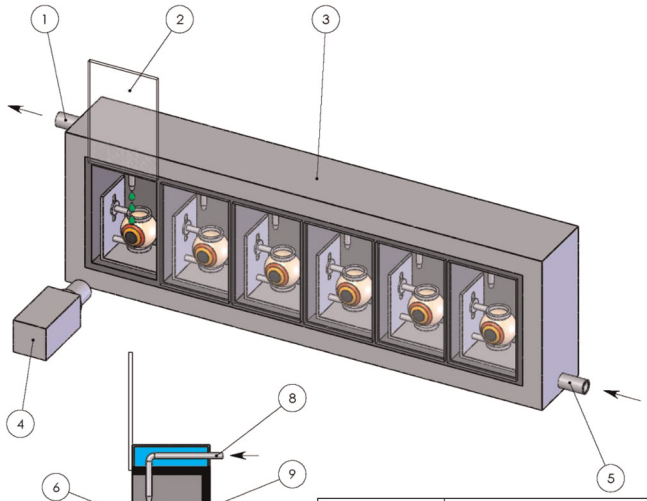
(3) Baseret på resultater fra BCOP og ICE.

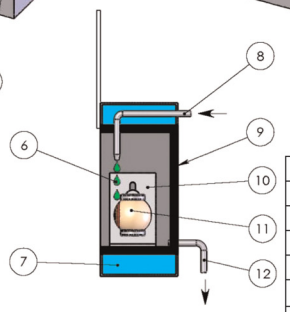
▼M2

*Tillæg 3*

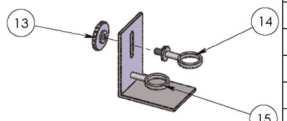
**Diagrammer over ICE-superfusionsapparatet og øjenholderne**

*(Se Burton et al. (17) for yderligere generiske beskrivelser af superfusionsapparatet og øjenholderen)*




TVÆRSNIT AF KAMMERET




ØJEHOLDER

| DEL NR. | BESKRIVELSE |
|---|---|
| 1 | VARMTVANDSUDTAG |
| 2 | SKYDEDØR |
| 3 | SUPERFUSIONSAPPARAT |
| 4 | OPTISK MÅLEINSTRUMENT |
| 5 | VARMTVANDSINDTAG |
| 6 | SALTOPLØSNING |
| 7 | VARMT VAND |
| 8 | SALTOPLØSNINGSINDTAG |
| 9 | KAMMER |
| 10 | ØJEHOLDER |
| 11 | KYLLINGEØJE |
| 12 | SALTOPLØSNINGSUDTAG |
| 13 | REGULERINGSSKRUE |
| 14 | REGULERBAR ØVRE ARM |
| 15 | FAST NEDRE ARM |

▼M3

## B.49. IN VITRO-MIKROKERNETEST I PATTEDYRCELLER

INDLEDNING

1. En in vitro-mikrokernetest (MNvit-test) er en genotoksicitetstest til påvisning af mikrokerner (MN) i cytoplasma i interfaseceller. Mikrokerner kan dannes ud fra acentriske kromosomfragmenter (dvs. uden en centromer), eller hele kromosomer, som ikke kan migrere til polerne under celledelingens anafase. Assayet påviser klastogene og aneugene kemikaliers (stoffer og blandinger) virkninger (1) (2) i celler, der er blevet delt under eller efter eksponering for teststoffet. I denne testmetode (TM) kan der anvendes protokoller med og uden aktinpolymeriseringsinhibitoren cytochalasin B (cytoB). Tilsætningen af cytoB inden mitosen muliggør identifikation og selektiv analyse af mikrokerneforekomsten i celler, der har afsluttet mitosen, da sådanne celler er binukleære (3) (4). I denne TM kan der desuden anvendes protokoller uden cytokineseblokerende stof, hvis det kan dokumenteres, at analyserede cellepopulation har undergået mitose.

2. Ud over anvendelse af MNvit-assayet til identifikation af kemikalier (stoffer og blandinger), der inducerer mikrokerner, kan anvendelsen af et cytokineseblokerende stof, immunkemisk mærkning af kinetokorer eller hybridisering med centromeriske/telomeriske prober (fluorescerende in situ-hybridisering (FISH)) også tilvejebringe oplysninger om mekanismerne for kromosomskade og mikrokernedannelse (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Mærknings- og hybridiseringsprocedurerne kan anvendes i tilfælde af øget mikrokernedannelse, hvis forsøgslederen ønsker at bestemme, om forøgelsen skyldtes klastogene og/eller aneugene begivenheder.

3. Mikrokerner er skader, der er blevet overført til datterceller, hvorimod kromosomaberrationer i metafaseceller ikke nødvendigvis er overført. Da mikrokerner i interfaseceller kan vurderes relativt objektivt, behøver laboratoriepersonalet kun at bestemme, om cellerne har delt sig eller ej, og hvor mange celler der indeholder en mikrokerne. Præparaterne kan derfor bedømmes relativt hurtigt, og analysen kan automatiseres. Det gør det praktisk at bedømme tusindvis i stedet for hundredvis af celler pr. behandling, hvilket øger assayets ydeevne. Da mikrokerner kan dannes ud fra tiloversblevne kromosomer, er det endeligt muligt at påvise aneuploidiinducerende stoffer, som er vanskelige at undersøge i konventionelle test for kromosomaberrationer, f.eks. OECD Test Guideline 473 (kapitel B.10 i dette bilag) (17). MNvit-assayet kan dog ikke anvendes til at differentiere polyploidiinducerende kemikalier fra klastogenicitetinducerende kemikalier uden særlige teknikker såsom FISH, der er beskrevet i punkt 2.

4. MNvit-assayet er en in vitro-metode, der typisk anvender dyrkede celler fra mennesker eller gnavere. Den danner et solidt grundlag for in vitro-undersøgelse af potentialet for kromosomskade, da både aneugener og klastogener kan påvises.

5. MNvit-assayet er solid og effektiv til en lang række celletyper og til påvisning af forekomsten eller fraværet af cytoB. Der findes omfattende data, der påviser gyldigheden af MNvit-assayet, hvor der anvendes forskellige cellelinjer fra gnavere (CHO, V79, CHL/IU ogL5178Y) og humane lymfocytter (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31), herunder navnlig de internationale valideringsundersøgelser koordineret af Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22) og rapporterne fra den internationale workshop vedrørende testning for

▼M3

genotoksicitet (4) (16). De tilgængelige data er desuden blevet revurderet i forbindelse med en retrospektiv weight-of-evidence-undersøgelse gennemført af Det Europæiske Center for Validering af Alternative Metoder (ECVAM) under Europa-Kommissionen, og ECVAM's videnskabelige rådgivende udvalg (ESAC) har godkendt testmetoden som videnskabeligt underbygget (32) (33) (34). Anvendelsen af den humane lymfoblastcellelinje TK6 (35), HepG2-celler (36) (37) og primære embryoceller fra syrisk hamster (38) er blevet beskrevet, selv om de ikke er blevet anvendt i valideringsundersøgelser.

DEFINITIONER

6. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

7. Normalt kræver en in vitro-test, at der benyttes en eksogen metabolisk aktivering, medmindre cellerne er metabolisk kompetente i forhold til teststoffet. Metabolismeaktiveringssystemet efterligner ikke fuldstændigt in vivo-forholdene. Man må desuden omhyggeligt undgå betingelser, som fører til et artefakt positivt resultat, der ikke skyldes selve mutageniciteten, men kan være forårsaget af faktorer som væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet eller af høj cytotoksicitet (39) (40) (41). Hvis et testkemikalie forårsager en pH-ændring af mediet på tilsætningstidspunktet, skal pH justeres, helst ved buffering af stamopløsningen, således at alle voluminer ved alle testkoncentrationer og for alle kontrolprøver forbliver de samme.

8. Ved analyse af induktion af mikrokerner er det afgørende, at både behandlede og ubehandlede kulturer har undergået mitose. Den mest informative fase for bedømmelse af mikrokerner er i celler, som har afsluttet mitosen under eller efter behandling med teststoffet.

TESTPRINCIPPET

9. Cellekulturer fra mennesker eller pattedyr eksponeres for teststoffet både med og uden en eksogen metabolisk aktivering, medmindre der anvendes celler med en tilstrækkelig metaboliseringsevne. I alle forsøg medtages sideløbende positive kontrolprøver (PC) og kontrolprøver med opløsningsmiddel/bærestof (VC).

10. Under eller efter eksponering for teststoffet dyrkes cellerne i tilstrækkelig lang tid til, at kromosom- eller tentrådsskade medfører dannelse af mikrokerner i interfaseceller. Ved induktion af aneuploidi skal teststoffet normalt være til stede under mitosen. Høstede og farvede interfaseceller analyseres for tilstedeværelse af mikrokerner. Ideelt set bør mikrokerner kun bedømmes i celler, som har afsluttet mitosen under eksponering for teststoffet eller i påkommende tilfælde i perioden efter eksponering. I kulturer, som er blevet behandlet med et cytokineseblokerende stof, gøres dette ved kun at bedømme binukleære celler. Såfremt der ikke anvendes et cytokineseblokerende stof, er det vigtigt at påvise, at det er sandsynligt, at de analyserede celler er blevet delt under eller efter eksponering for teststoffet. For alle protokoller er det vigtigt at påvise, at der er sket celleproliferation i både kontrolkulturerne og de behandlede kulturer, og omfanget af den teststofinducerede cytotoksicitet eller cytostase skal vurderes i kulturerne (eller i parallelle kulturer), som bedømmes for forekomst af mikrokerner.

▼M3

BESKRIVELSE AF ASSAYET

*Præparater*

11. Der kan anvendes dyrkede primære perifere blodlymfocytter fra det perifere blod hos mennesker (5) (19) (42) (43) og en række cellelinjer fra gnavere såsom CHO, V79, CHL/IU, og L5178Y-celler (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Anvendelsen af andre cellelinjer og -typer skal være baseret på dokumenteret ydeevne i assayet som beskrevet i afsnittet om acceptkriterier. Da baggrundsforekomsten af mikrokerner vil påvirke assayets følsomhed, anbefales det, at der anvendes celletyper med en lav, stabil baggrundsforekomst af mikrokernedannelse.

12. Perifere humane blodlymfocytter skal udtages fra unge (ca. 18-35 år), sunde, ikkerygende personer uden nylige kendte eksponeringer for genotoksiske kemikalier eller bestråling. Hvis celler fra mere end en doner pooles, skal antallet af donorer angives. Mikrokerneforekomsten forøges med alderen, og denne udvikling er mere markant hos kvinder end hos mænd (44), og der skal tages i betragtning ved udvælgelsen af donorceller til pooling.

Medier og dyrkningsbetingelser

13. Til vedligeholdelse af kulturerne benyttes der egnede dyrkningssubstrater og inkuberingsbetingelser (dyrkningsflasker, $CO_2$-koncentration, temperatur og fugtighed). Etablerede cellelinjer og -stammer kontrolleres regelmæssigt for stabilt normalt kromosomtal og mykoplasmakontaminering, og i tilfælde af kontaminering, eller hvis det normale kromosomtal har ændret sig, anvendes kulturen ikke. Cellernes normale cykluslængde og dyrkningsbetingelserne i laboratoriet skal være kendt. Ved anvendelse af cytokineseblokeringsmetoden skal koncentrationen af cytokineseinhibitoren optimeres for den særlige celletype og påvise et godt udbytte af binukleære celler til bedømmelse.

Fremstilling af kulturer

14. Etablerede cellelinjer og -stammer: Celler udtages fra stamkulturer og udsås i dyrkningssubstrat med en sådan tæthed, at kulturerne ikke flyder sammen inden høst, og inkuberes ved 37 °C.

15. Lymfocytter: Fuldblod, der er behandlet med antikoaguleringsmiddel (f.eks. heparin), eller fraseparerede lymfocytter dyrkes i substratet, der indeholder et mitogen, f.eks. phytohæmagglutinin (PHA), inden eksponering for teststoffet og cytoB.

Metabolisk aktivering

16. Eksogene metaboliserende systemer skal anvendes, når der gøres brug af celler med utilstrækkelige endogene metaboliske egenskaber. Det mest almindeligt anvendte system er en cofaktorsuppleret postmitokondriefraktion (S9), der fremstilles af levere fra rotter, der har været behandlet med enzyminducerende stoffer såsom Aroclor 1254 (45) (46) eller en blanding af phenobarbiton og β-naphthoflavon (46) (47) (48) (49). Den sidstnævnte blanding er ikke i strid med Stockholmkonventionen om persistente organiske miljøgifte (50) og forordning (EF) nr. 850/2004 om persistente organiske miljøgifte (66) og har vist sig at være lige så effektiv som Aroclor 1254 til induktion af oxidaser med blandet funktion (46) (47) (48) (49). S9-fraktionen anvendes normalt i en koncentration på 1-10 % (v/v) i det færdige testsubstrat. Et metabolismeaktiveringssystems beskaffenhed kan afhænge af, hvilken kemisk klasse teststoffet tilhører, og i nogle tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at benytte mere end én S9-koncentration.

▼M3

17. Genetisk konstruerede cellelinjer, der udtrykker specifikke aktiverende enzymer fra mennesker eller gnavere, kan fjerne behovet for et eksogen metabolisk aktiveringssystem og kan anvendes som testceller. I disse tilfælde skal valget af en bestemt cellelinje begrundes sagligt f.eks. ved, at oxidaserne med blandet funktion er relevante for teststoffets metabolisme (51), og at de er følsomme over for kendte klastogener og aneugener (se særskilt afsnit om acceptkriterier). Man skal være opmærksom på, at teststoffet ikke altid metaboliseres af de(n) udtrykte oxidase(r) med blandet funktion. I dette tilfælde indebærer negative testresultater ikke, at teststoffet ikke kan fremkalde mikrokerner.

Fremstilling af teststof

18. Testkemikalier i fast form opløses eller opslæmmes i passende opløsningsmidler eller bærestoffer og fortyndes eventuelt inden behandling af cellerne. Testkemikalier i væskeform kan enten tilsættes direkte til testsystemet og/eller fortyndes inden behandlingen. Gasser og flygtige stoffer skal testes ved passende modifikation af standardprotokollerne, f.eks. i forseglede dyrkningsflasker (52) (53). Der benyttes frisk fremstillede teststofpræparater, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

*Testbetingelser*

Opløsningsmidler/bærestoffer

19. Opløsningsmidlet/bærestoffet må ikke reagere med teststoffet eller hæmme cellernes overlevelse eller S9-aktiviteten ved den anvendte koncentration. Benyttes der andre opløsningsmidler/bærestoffer end de velkendte (f.eks. vand, dyrkningssubstrat, dimethylsulfoxid), skal brugen af dem underbygges med data, der viser deres kompatibilitet med teststoffet og fraværet af genetisk toksicitet. Det anbefales i videst muligt omfang først at forsøge at benytte et vandigt opløsningsmiddel/bærestofsystem.

Anvendelse af cytoB som cytokineseblokerende stof

20. Et af de vigtigste aspekter i forbindelse med MNvit-assayet er at sikre, at de bedømte celler har afsluttet mitosen under behandlingen eller i påkommende tilfælde i inkubationsperioden efter behandlingen. CytoB har været det mest anvendte stof til at hæmme cytokinese, da det hæmmer samlingen af aktin og således forhindrer deling af datterceller efter mitose, hvilket resulterer i dannelsen af binukleære celler (5) (54) (55). Bedømmelsen af mikrokerne kan således begrænses til celler, der har undergået mitose under eller efter behandling. Teststoffets indvirkning på celleproliferationens kinetik kan måles samtidigt. CytoB bør anvendes som cytokineseblokerende stof, når der gøres brug af humane lymfocytter, da cellecykluslængder varierer inden for kulturer og mellem donorer, og da det ikke er alle lymfocytter, der reagerer på PHA. Der har været anvendt andre metoder ved test af cellelinjer for at bestemme, om de bedømte celler har delt sig (se punkt 26).

21. Laboratoriet skal vælge den passende koncentration af cytoB for hver celletype for at opnå den optimale forekomst af binukleære celler i kontrolkulturerne med opløsningsmiddel/bærestof. Den passende koncentration af cytoB ligger normalt mellem 3 og 6 μg/ml.

▼M3

Måling af celleproliferation og cytotoksicitet og valg af eksponeringskoncentrationer

22. Ved valg af højeste koncentration af teststoffet, der skal testes, bør man undgå koncentrationer, der kan frembringe artefakt positiv respons, f.eks. koncentrationer, der frembringer for høj cytotoksicitet, udfældning i et dyrkningssubstrat og væsentlige ændringer i pH eller osmolalitet (39) (40) (41).

23. Målinger af celleproliferation foretages for at sikre, at de behandlede celler har undergået mitose under assayet, og at behandlingerne udføres med passende cytotoksicitet (se punkt 29). Cytotoksiciteten bestemmes med og uden metabolisk aktivering i celler, der kræver metabolisk aktivering, ved hjælp af relativ forøgelse af celletal (RICC) eller relativ populationsfordobling (RPD) (se formlerne i tillæg 2), medmindre cytoB anvendes. Ved anvendelse af cytoB kan cytotoksiciteten bestemmes ved hjælp af replikationsindekset (RI) (se formlen i tillæg 2).

24. Behandling af kulturer med cytoB og måling af de relative forekomster af mononukleære, binukleære og multinukleære celler i kulturen er en nøjagtig metode til kvantificering af indvirkningen på celleproliferationen og en behandlings cytotoksiske eller cytostatiske virkning (5) og sikrer, at der udelukkende bedømmes celler, som delte sig under eller efter behandling.

25. I undersøgelser med cytoB kan cytostase/cytotoksicitet kvantificeres ved hjælp af proliferationsindekset for cytokineseblokerende stof (CBPI) (5) (26) (56) eller udledes af RI fra mindst 500 celler pr. kultur (se formlerne i tillæg 2). Når cytoB anvendes til vurdering af celleproliferationen, bestemmes CBPI eller RI ud fra mindst 500 celler pr. kultur. Disse målinger kan indgå i vurderingen af cytotoksiciteten ved at sammenligne værdier i de behandlede kulturer og kontrolkulturerne. Vurdering af andre cytotoksicitetsmarkører (f.eks. konfluens, celleantal, apoptose, nekrose, antal metafaser) kan give nyttige oplysninger.

26. I undersøgelser uden cytoB er det nødvendigt at påvise, at de bedømte celler i kulturen er blevet delt under eller efter behandling med teststoffet, idet der i modsat fald kan fremkaldes et falsk negativt respons. De metoder, der er blevet anvendt til at sikre, at de celler, som bedømmes, har delt sig, omfatter inkorporering og efterfølgende påvisning af bromdeoxyuridin (BrdU) til identifikation af celler, der har replikeret sig (57), dannelse af kloner, når celler fra etablerede cellelinjer behandles og bedømmes in situ på et mikroskopobjektglas (proliferationsindeks (PI)) (25) (26) (27) (28), eller måling af relativ populationsfordobling (RPD) eller relativ forøgelse af celletal (RICC) eller andre påviste metoder (16) (56) (58) (59) (se formlerne i tillæg 2). Vurdering af andre cytotoksicitets- eller cytostasemarkører (f.eks. konfluens, celleantal, apoptose, nekrose, antal metafaser) kan give nyttige oplysninger.

27. Der benyttes mindst tre analyserbare testkoncentrationer. For at opnå dette kan det være nødvendigt at udføre forsøget med et større antal koncentrationer med tætte intervaller og analysere mikrokernedannelsen i disse koncentrationer med passende cytotoksicitet. En alternativ strategi er at udføre en indledende cytotoksicitetstest for at indsnævre koncentrationsområdet for den endelige test.

28. Den højeste koncentration bør frembringe en cytotoksicitet på 55 ± 5 %. Højere niveauer kan inducere kromosomskade som en bivirkning af cytotoksicitet (60). Hvis der er tale om cytotoksicitet, skal de valgte koncentrationer dække et interval fra det, der frembringer en cytotoksicitet på 55 ± 5 %, til ringe eller ingen cytotoksicitet.

▼M3

29. Hvis der ikke observeres cytotoksicitet eller bundfald, må testkoncentrationen højst være 0,01 M, 5 mg/ml eller 5 µl/ml (den laveste af de tre). De valgte koncentrationer til analyse skal generelt adskilles med en spredning på højst 10. I forbindelse med teststoffer med en stejl koncentrations-responskurv kan det være nødvendigt at mindske spredningen af teststofkoncentrationerne, således at kulturer med moderat og lav toksicitet også bedømmes.

30. Når opløselighed er en begrænsende faktor, skal den højeste koncentration, hvis den ikke er begrænset af cytotoksicitet, være den laveste koncentration med synlig udfældning i kulturer, forudsat at bundfaldet ikke har indflydelse på bedømmelsen. Evalueringen af udfældningen foretages ved hjælp af metoder som lysmikroskopi, og vedvarende bundfald eller bundfald, der fremkommer under dyrkningen (efter behandlingens afslutning), noteres.

Kontrolprøver

31. Der foretages sideløbende positive kontrolprøver og kontrolprøver med opløsningsmiddel/bærestof med og uden metabolisk aktivering i hvert forsøg.

32. Positive kontrolprøver anvendes til at påvise de anvendte cellers og testprotokollens evne til at identificere klastogener og aneugener og til at bekræfte S9-blandingens metaboliske egenskaber. I positive kontrolprøver benyttes kendte induktorer af mikrokernedannelse i koncentrationer, der forventes at give små, men reproducerbare forøgelser i forhold til baggrundsværdierne, hvorved testsystemets følsomhed godtgøres. Der vælges sådanne koncentrationer i de positive kontrolprøver, at virkningerne er tydelige, uden dog at de kodede objektglas' identitet umiddelbart afsløres for den, der aflæser dem.

33. Et klastogen, der kræver metabolisk aktivering (f.eks. cyclofosfamid, enzo[a]pyren), anvendes til påvisning af den metaboliske evne og testsystemets evne til at påvise klastogener. Andre positive kontrolprøver kan anvendes, hvis der er grund til det. Da nogle positive kontrolprøver, som kræver metabolisk aktivering, kan være aktive uden eksogen metabolisk aktivering i visse behandlingssituationer eller i visse cellelinjer, skal behovet for metabolisk aktivering og S9-blandingens aktivitet testes i de valgte cellelinjer og ved de valgte koncentrationer.

34. For indeværende er der ingen kendte aneugener, som kræver metabolisk aktivering for at bedømme deres gentoksiske virkninger (16). Positive kontrolprøver til påvisning af aneugen aktivitet, der accepteres i dag, er f.eks. colchicin og vinblastin. Der kan anvendes andre kemikalier, hvis de udelukkende eller primært inducerer mikrokerner gennem aneugen aktivitet. For at undgå behovet for to positive kontrolprøver (for klastogenicitet og aneugenicitet) uden metabolisk aktivering kan aneugenicitetskontrollen fungere som positiv kontrolprøve uden S9, og klastogenicitetskontrollen kan anvendes til at teste tilstrækkeligheden af det anvendte metaboliske aktiveringssystem. Positive kontrolprøver for både klastogenicitet og aneugenicitet skal anvendes i celler, som ikke kræver S9. Anbefalede positive kontrolprøver er angivet i tillæg 3.

35. Hvis der er mulighed for det, bør der anvendes kemisk beslægtede positive kontrolstoffer. Alle anvendte positive kontrolstoffer skal være egnet for celletypen og aktiveringsforholdene.

▼M3

36. Der skal i hver høst indgå negative (opløsningsmiddel eller bærestof) kontrolprøver. Desuden skal der anvendes ubehandlede negative kontrolprøver (uden opløsningsmiddel/bærestof), medmindre der foreligger offentliggjorte eller historiske kontroldata fra laboratorieforsøg, der viser, at det valgte opløsningsmiddel ved de anvendte koncentrationer ikke har nogen genotoksiske eller andre skadelige virkninger.

TESTPROCEDURE

*Behandlingsplan*

37. For at maksimere sandsynligheden for at påvise aneugeners eller klastogeners aktivitet i en bestemt fase i cellecyklussen er det vigtigt, at et tilstrækkeligt antal celler behandles med teststoffet i alle cellecyklussens faser. Behandlingsplanen for cellelinjer og primære cellekulturer kan derfor være forskellig fra behandlingsplanen for lymfocytter, der kræver stimulering med mitogen for at sætte cellecyklussen i gang, og disse behandles i punkt 41-43 (16).

38. Teoretiske overvejelser og offentliggjorte data (18) viser, at de fleste aneugener og klastogener vil blive påvist efter en kortvarig behandlingsperiode på 3-6 timer med eller uden tilsætning af S9, efterfølgende fjernelse af teststoffet og en vækstperiode på 1,5-2 gange en normal cellecyklus (6). Cellerne udtages efter et tidsrum, der svarer til ca. 1,5-2 gange den normale (dvs. ubehandlede) cellecykluslængde, regnet fra behandlingens start eller afslutning (se tabel 1). Prøveudtagnings- og restitutionsperioden kan udvides, hvis man ved eller har mistanke om, at teststoffet påvirker cellecykluslængden (f.eks. ved test af nucleosidanaloger).

39. På grund af den potentielle cytotoksiske virkning af S9-blandinger til dyrkede pattedyrceller udvides eksponeringsperioden til at dække 1,5-2 gange en normal cellecyklus uden tilsætning af S9. Udvides eksponeringsperioden er der flere muligheder for behandling af cellerne med testkemikaliet uden og med tilsætning af cytoB. Med disse valgmuligheder tages der højde for situationer, der kan give anledning til bekymring over risikoen for interaktion mellem teststoffet og cytoB.

40. De anbefalede behandlingsplaner fremgår af tabel 1. Disse generelle behandlingsplaner kan ændres afhængigt af teststoffets stabilitet eller reaktivitet eller de anvendte cellers særlige vækstegenskaber. Alle behandlinger skal indledes og afsluttes, medens cellevæksten stadig er eksponentiel. Der redegøres nærmere for denne tidsplan i punkt 41-47 nedenfor.

*Tabel 1*

**Tidsplan for cellebehandling og høst for MNvit-assayet**

| | | |
|---|---|---|
| Lymfocytter, primærceller og cellelinjer behandlet med cytoB | + S9 | Behandles i 3-6 timer med tilsætning af S9<br>S9 og behandlingsmediet fjernes<br>Friskt medium og cytoB tilsættes<br>Høstes efter 1,5-2 gange en normal cellecyklus. |
| | – S9<br>Kortvarig eksponering | Behandles i 3-6 timer<br>Behandlingsmediet fjernes<br>Friskt medium og cytoB tilsættes<br>Høstes efter 1,5-2 gange en normal cellecyklus. |

▼M3

| | | |
|---|---|---|
| | – S9<br>Udvidet eksponering | *Valgmulighed A:* Behandles i 1,5-2 gange en normal cellecyklus med tilsætning af cytoB<br>Høstes ved afslutningen af eksponeringsperioden.<br>*Valgmulighed B:* Behandles i 1,5-2 gange en normal cellecyklus<br>Teststoffet fjernes<br>Friskt medium og cytoB tilsættes<br>Høstes efter 1,5-2 gange en normal cellecyklus. |
| Cellelinjer behandlet uden cytoB<br>(Samme behandlingsplan som anført ovenfor, bortset fra at der ikke tilsættes cytoB) | | |

*Lymfocytter, primærceller og cellelinjer behandlet med cytoB*

41. For lymfocytter er den mest effektive tilgang at indlede eksponeringen for teststoffet 44-48 timer efter PHA-stimuleringen, når synkroniseringen af cyklussen er afsluttet (5). I det første assay behandles cellerne i 3-6 timer med teststoffet uden og med tilsætning af S9. Behandlingsmediet fjernes og erstattes af et friskt medium med cytoB, og cellerne høstes efter 1,5-2 gange en normal cellecyklus.

42. Hvis de to første test med kortvarig (3-6 timer) behandling er negative eller tvetydige, udvides eksponeringsperioden uden tilsætning af S9. Der findes to behandlingsmuligheder, som er lige brugbare. Det kan imidlertid være mere hensigtsmæssigt at vælge valgmulighed A i forbindelse med stimulerede lymfocytter, hvor den eksponentielle vækst kan være faldende 96 timer efter stimulering. Desuden vil cellekulturerne ikke have konflueret på tidspunktet for den endelige prøveudtagning ved anvendelse af valgmulighed B.

— Valgmulighed A: Cellerne behandles med teststoffet i et tidsrum, der svarer til 1,5-2 gange en normal cellecyklus, og høstes ved afslutningen af eksponeringsperioden.

— Valgmulighed B: Cellerne behandles med teststoffet i 1,5-2 gange en normal cellecyklus. Behandlingsmediet fjernes og erstattes af et friskt medium, og cellerne høstes efter yderligere 1,5-2 gange en normal cellecyklus.

43. Primærceller og cellelinjer behandles på samme måde som lymfocytter, bortset fra at det ikke er nødvendigt at stimulere dem med PHA i 44-48 timer. Andre celler end lymfocytter skal eksponeres på en sådan måde, at cellerne ved afslutningen af eksponeringsperioden fortsat er i den logaritmiske vækstfase.

*Cellelinjer uden cytoB*

44. Celler behandles i 3-6 timer med og uden tilsætning af S9. Behandlingsmediet fjernes og erstattes af et friskt medium, og cellerne høstes efter 1,5-2 gange en normal cellecyklus.

▼M3

45. Hvis de to første test med kortvarig (3-6 timer) behandling er negative eller tvetydige, udvides eksponeringsperioden (uden tilsætning af S9). Der findes to behandlingsmuligheder, som er lige brugbare.

— Valgmulighed A: Cellerne behandles med teststoffet i 1,5-2 gange en normal cellecyklus og høstes ved afslutningen af eksponeringsperioden.

— Valgmulighed B: Cellerne behandles med teststoffet i 1,5-2 gange en normal cellecyklus. Behandlingsmediet fjernes og erstattes af et friskt medium, og cellerne høstes efter yderligere 1,5-2 gange en normal cellecyklus.

46. I encellede lag kan der være mitotiske celler (runde celler, der er løsrevet fra overfladen) til stede efter eksponeringen på 3-6 timer. Da disse mitotiske celler løsrives nemt, kan de gå tabt, når mediet med teststoffet fjernes. Det er vigtigt at indsamle disse celler, når kulturerne vaskes, og at føre dem tilbage til kulturerne for ikke at miste celler, der er i mitose, og hvor der er risiko for dannelse af mikrokerner på høsttidspunktet.

*Antal kulturer*

47. Der benyttes dobbeltbestemmelse ved hver koncentration af teststof og for negative kontrolkulturer med opløsningsmiddel/bærestof. Hvis det på grundlag af data fra tidligere laboratorieforsøg kan godtgøres, at forskellen mellem dobbeltbestemmelser er minimal, kan enkeltbestemmelse accepteres. Benyttes der kun én kultur, anbefales det at øge antallet af koncentrationer til analyse.

*Cellehøst og præparering af objektglas*

48. Høst og præparering foregår særskilt for hver enkelt kultur. Præpareringen af celler kan bestå i hypotonisk behandling, men dette er ikke nødvendigt, hvis der opnås en tilstrækkelig spredning af cellerne på anden vis. Der kan anvendes forskellige teknikker til præparering af objektglas, forudsat at der fremstilles cellepræparater af høj kvalitet til bedømmelse. Cellens cytoplasma anvendes til påvisning af mikrokerner og (ved cytokineseblokeringsmetoden) pålidelig identifikation af binukleære celler.

49. Objektglassene kan farves ved hjælp af forskellige metoder, f.eks. med Giemsa- eller fluorescerende dna-specifikke farvestoffer (59). Ved at bruge en dna-specifik farvning (f.eks. acridinorange (61) eller Hoechst 33258 plus pyronin-Y (62)) kan man undgå nogle af de artifakter, der optræder ved ikke-dna-specifik farvning. Anti-kinetokor-antistoffer, FISH med pancentromeriske dna-prober eller primet in situ-mærkning med pancentromerspecifikke primere og egnet dna-kontrastfarvning kan anvendes til identifikation af mikrokerners indhold (kromosom/kromosomfragment), hvis der er brug for mekanistisk information og dannelsen heraf (15) (16). Andre metoder til differentiering mellem klastogener og aneugener kan anvendes, hvis de har vist sig at være effektive.

*Analyse*

50. Alle objektglas, herunder kontrolprøver med opløsningsmiddel/bærestof, kodes uafhængigt inden mikroskoperingen. Alternativt analyseres kodede prøver ved hjælp af et valideret system til automatisk flow-cytometri- eller billedanalyse.

▼M3

51. I cytoB-behandlede kulturer analyseres mikrokerneforekomsten i mindst 2 000 binukleære celler pr. koncentration (mindst 1 000 binukleære celler pr. kultur, to kulturer pr. koncentration). Benyttes der kun én kultur, bedømmes mindst 2 000 binukleære celler pr. koncentration fra den pågældende kultur. Hvis der er væsentligt færre end 1 000 binukleære celler pr. kultur, eller færre end 2 000, hvis der kun benyttes én kultur, til bedømmelse i hver koncentration, og hvis der ikke påvises en væsentlig forøgelse af antallet af mikrokerner, gentages testen med flere celler eller i mindre toksiske koncentrationer afhængigt af forholdene. Det er vigtigt at undlade at bedømme binukleære celler med uregelmæssige former, eller hvor de to kerner har en meget forskellig størrelse, og binukleære celler må heller ikke forveksles med ujævnt udstrøgne multinukleære celler. Celler med mere end to hovedkerner analyseres ikke for forekomsten af mikrokerner, da mikrokerneforekomsten i forvejen kan være højere i disse celler (63) (64). Det er acceptabelt at bedømme mononukleære celler, hvis det påvises, at teststoffet griber ind i cytoB-aktiviteten.

52. I cellelinjer, der ikke behandles med cytoB, bedømmes mikrokerneforekomsten i mindst 2 000 celler pr. koncentration (mindst 1 000 celler pr. kultur, to kulturer pr. koncentration). Benyttes der kun én kultur pr. koncentration, bedømmes mindst 2 000 celler fra den pågældende kultur.

53. Når cytoB anvendes, bestemmes CBPI eller RI til vurdering af celleproliferationen (se tillæg 2) ud fra mindst 500 celler pr. kultur. Ved behandling uden tilsætning af cytoB er det afgørende at dokumentere, at de celler, der bedømmes, har formeret sig, jf. punkt 24-27.

*Acceptkriterier*

54. Et laboratorium, der ønsker at udføre det MNvit-assay, der er beskrevet i denne TM, skal påvise, at det har kompetence til på pålidelig og nøjagtig vis at identificere kemikalier med kendt aneugen og klastogen aktivitet og med eller uden metabolisk aktivering såvel som kendte negative kemikalier på grundlag af referencekemikalierne i tillæg 3. Som dokumentation for dets kompetence til at udføre denne TM korrekt skal laboratoriet dokumentere, at kernedelingen af de celler, der bedømmes for mikrokernedannelse, er afsluttet, hvis testen udføres uden tilsætning af cytoB.

55. Det anbefales at anvende kemikalierne i tillæg 3 som referencekemikalier. Det er muligt at tilføje eller erstatte kemikalier, hvis deres aktivitet er kendt, og hvis de inducerer mikrokerner ved hjælp af de samme mekanismer, og hvis det påvises, at de er egnede for de kemikalier, som skal testes ved hjælp af MNvit-assayet. Begrundelsen kan omfatte en valideringsundersøgelse af en bred vifte af stoffer eller en undersøgelse med fokus på et snævrere spektrum baseret på teststoffets kemiske gruppe eller de undersøgte skadevirkninger.

56. Kontrolkulturer med opløsningsmiddel/bærestof og ubehandlede kulturer bør resultere i reproducerbart lave og konsistente mikrokerneforekomster (typisk 5-25 mikrokerner/1 000 celler for de celletyper, der er identificeret i punkt 11). Andre celletyper kan have andre responsintervaller, der skal fastslås ved valideringen af deres anvendelse i MNvit-assayet. Data fra negative kontrolprøver med opløsningsmiddel og positive kontrolprøver anvendes til at fastslå historiske kontrolintervaller. Disse værdier indgår i vurderingen af, om de sideløbende negative/positive kontrolprøver opfylder kravene til forsøg.

▼M3

57. Hvis der foreslås mindre ændringer til protokollen (f.eks. anvendelse af automatiserede i stedet for manuelle bedømmelsesteknikker, anvendelse af en ny celletype), skal ændringens effektivitet påvises, inden den modificerede protokol kan accepteres. Det skal i denne forbindelse påvises, at det er muligt at identificere de vigtigste mekanismer for kromosomskade og gevinst eller tab, og at der kan opnås korrekte positive og negative resultater for den enkelte stofgruppe eller det brede spektrum af stoffer, der skal testes.

DATA OG RAPPORTERING

*Behandling af resultater*

58. Ved cytokineseblokeringsmetoden tages der kun højde for forekomsten af binukleære celler med mikrokerner (uafhængigt af antallet af mikrokerner pr. celle) ved vurdering af induktionen af mikrokerner. Det er ikke obligatorisk at bedømme antallet af celler med en, to eller flere mikrokerner, men det kan give nyttige oplysninger.

59. Der foretages sideløbende målinger af cytotoksicitet og/eller cytostase for alle behandlede kulturer samt kontrolkulturer med opløsningsmiddel/bærestof (58). Ved cytokineseblokeringsmetoden udregnes CBPI eller RI for alle behandlede kulturer og kontrolkulturer som målinger af cellecyklusforsinkelse. Hvis cytoB ikke anvendes, anvendes RPD-, RICC- eller PI-metoden (se tillæg 2).

60. Der anføres data for hver enkelt kultur. Desuden sammenfattes alle data i tabelform.

61. Når kemikalier inducerer mikrokerne i MNvit-assayet, kan det skyldes, at de fremkalder kromosombrud, kromosomtab eller en kombination heraf. Yderligere analyse med anvendelse af anti-kinetokor-antistof, centromeriske in situ-prober eller andre metoder kan anvendes til at bestemme, om induktionen af mikrokerner skyldes klastogen og/eller aneugen aktivitet.

*Evaluering og fortolkning af resultater*

62. Der er ingen krav om verifikation af et klart positivt eller negativt resultat ved hjælp af yderligere forsøg. Tvetydige resultater kan afklares ved analyse af yderligere 1 000 celler fra alle kulturerne for at undgå tab af blinding. Hvis denne tilgang ikke afklarer resultatet, udføres der yderligere test. Ved opfølgende forsøg bør det overvejes at ændre undersøgelsesparametrene og udvide eller indskrænke forsøgsbetingelserne i relevant omfang. Blandt de undersøgelsesparametre, der kan ændres på, er testkoncentrationernes spredning, tidsplanen for behandling og cellehøst og/eller metabolismeaktiveringen.

63. Der findes en række kriterier for opnåelse af et positivt resultat, f.eks. en koncentrationsafhængig forøgelse eller en statistisk signifikant forøgelse af antallet af celler med mikrokerner. Der bør i første række ses på resultaternes biologiske relevans. Det kan være nyttigt at undersøge, om de observerede værdier ligger inden eller uden for det historiske kontrolinterval, ved vurderingen af responsets biologiske signifikans. Egnede statistiske metoder kan benyttes som hjælpemiddel ved evalueringen af testresultaterne (65). Dosis-responsforholdet skal imidlertid også indgå i bedømmelsen af de statistiske testresultater. Reproducerbarhed og historiske data skal også tages i betragtning.

▼M3

64. De fleste forsøg giver klart positivt eller negativt resultat, men i nogle tilfælde giver dataene ikke mulighed for en endegyldig bedømmelse af teststoffets aktivitet. Resultatet kan stadig være tvetydigt eller tvivlsomt, uanset hvor mange gange forsøget gentages.

65. Et positivt resultat af MNvit-assayet viser, at teststoffet fremkalder kromosombrud eller kromosomtab i dyrkede celler fra pattedyr. Et negativt resultat viser, at teststoffet under testbetingelserne ikke fremkalder kromosombrud og/eller gevinst eller tab af kromosomer i dyrkede celler fra pattedyr.

*Testrapport*

66. Testrapporten skal som minimum omfatte følgende oplysninger, hvis de er relevante for undersøgelsens gennemførelse:

*Testkemikalie*

— identifikationsoplysninger, CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number) og EF-nr.

— fysiske egenskaber og renhedsgrad

— fysisk-kemiske egenskaber, som er relevante for undersøgelsen

— testkemikaliets reaktivitet med opløsningsmiddel/bærestof eller celledyrkningsmedium

*Opløsningsmiddel/bærestof*

— begrundelse for valg af opløsningsmiddel/bærestof

— teststoffets opløselighed og stabilitet i opløsningsmiddel/bærestof

*Celler*

— den valgte celletype og oprindelse

— den valgte celletypes egnethed

— eventuelt fravær af mykoplasma

— oplysninger om cellecyklussens længde, fordoblingstid eller proliferationsindeks

— ved anvendelse af humane lymfocytter, bloddonorers køn, alder og antal, hvis det er relevant

— ved anvendelse af humane lymfocytter, om fuldblod eller fraseparerede lymfocytter eksponeres

— eventuelt antal passager

— eventuelle metoder til opretholdelse af cellekulturer

— normalt kromosomtal

— cellecyklussens normale længde (negativ kontrol)

*Testbetingelser*

— det cytokineseblokerende stofs (f.eks. cytoB) betegnelse og koncentration og længden af cellernes udsættelse for stoffet

— begrundelse for valg af koncentrationer og antal kulturer, herunder eventuelle cytotoksicitetsdata og opløselighedsbegrænsninger

— substratsammensætning og eventuel $CO_2$-koncentration

— teststofkoncentrationer

▼M3

— koncentration (og/eller volumen) af tilsat bærestof og teststof

— inkubationstemperatur og -periode

— behandlingens varighed

— høsttidspunkt efter behandling

— celletæthed ved udsåning, hvis det er relevant

— metabolismeaktiveringssystemets type og sammensætning, herunder acceptkriterier

— positive og negative kontrolprøver

— anvendte metoder til præparering af objektglas og farvningsteknik

— kriterier for identifikation af mikrokerner

— antal analyserede celler

— metoder til måling af cytotoksicitet

— eventuelle supplerende oplysninger vedrørende cytotoksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv, negativ eller tvetydig

— anvendte statistiske analysemetoder

— metoder som f.eks. anvendelse af kinetokor-antistof til bestemmelse af, om mikrokerner indeholder hele kromosomer eller kromosomfragmenter.

*Resultater*

— anvendt måling af cytotoksicitet, f.eks. CBPI eller RI ved anvendelse af cytokineseblokeringsmetoden, RICC, RPD eller PI, når cytokineseblokeringsmetoden ikke anvendes, andre relevante observationer, f.eks. cellekonfluens, apoptose, nekrose, antal metafaser, forekomst af binukleære celler

— tegn på udfældning

— data om pH og osmolalitet i behandlingsmediet, hvis disse værdier er målt

— definition af acceptable celler til analyse

— fordeling af mono-, bi- og multinukleære celler ved anvendelse af en cytokineseblokeringsmetode

— antal celler med mikrokerner, anført særskilt for hver behandlet kultur og kontrolkultur, og bestemmelse af, om de er indsamlet fra binukleære eller mononukleære celler, hvis det er relevant

— koncentrations-responssammenhængen, når det er muligt

— kemiske data (koncentrationer og opløsningsmidler) for sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver

— kemiske data for tidligere negative (opløsningsmiddel/bærestof) og positive kontrolprøver med angivelse af intervaller, gennemsnit, standardafvigelser og konfidensinterval (f.eks. 95 %)

— statistisk analyse og eventuelle P-værdier.

*Behandling af resultater*

*Konklusioner*

▼**M3**

LITTERATUR

(1) Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1-4.

(2) Parry, J.M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3-15.

(3) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233-246.

(4) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen*., 35, 167-172.

(5) Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084-1104.

(6) Fenech, M. and Morley, A.A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193-198.

(7) Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43.

(8) Eastmond, D.A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9-20.

(9) Miller, B.M., Zitzelsberger, H.F., Weier, H.U. and Adler, I.D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesis*, 6, 297-302.

(10) Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A.T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesis*, 8, 329-334.

(11) Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205-213.

(12) Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesis*, 8, 519-525.

(13) Eastmond, D.A, Rupa, D.S. and Hasegawa, L.S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9-20.

(14) Marshall, R.R., Murphy, M., Kirkland, D.J. and Bentley, K.S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233-245.

(15) Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211-219.

(16) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153-163.

▼M3

(17) OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [www.oecd.org/env/testguidelines]

(18) Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M.J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13-36.

(19) Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L.C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37-60.

(20) Aardema, M.J., Snyder, R.D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R.J., Gibson, D.P., Soelter, S., Curry, P.T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61-87.

(21) Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88-124.

(22) Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125-152.

(23) Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A.A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187-208.

(24) Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45-59.

(25) Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81-116.

(26) Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183-190.

(27) Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S.Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55-71.

(28) von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H.G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res*., 468, 137-163.

(29) Garriott, M.L., Phelps, J.B. and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123-134.

(30) Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesis*, 14, 569-580.

▼**M3**

(31) Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1-152.

(32) ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November, 2006, Available at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(33) ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel, Available at: [http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 23, 271-283.

(35) Zhang, L.S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105-115.

(36) Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin $B_1$ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 17, 257-260.

(37) Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B.J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315-328.

(38) Gibson, D.P., Brauninger, R., Shaffi, H.S., Kerckaert, G.A., LeBoeuf, R.A., Isfort, R.J. and Aardema, M.J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61-70.

(39) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147-205.

(40) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297-305.

(41) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen*., 8, 789-886.

(42) Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29-36.

(43) Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11-18.

(44) Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31-45.

▼**M3**

(45) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.

(46) Ong, T.-m., Mukhtar, M., Wolf, C.R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55-65.

(47) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.

(48) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F.J., Fouts, J. R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(49) Johnson, T.E., Umbenhauer, D.R. and Galloway, S.M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51-59.

(50) UNEP (2001), Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, United Nations Environment Programme (UNEP). Available at: [http://www.pops.int/]

(51) Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M. and Parry, J.M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesis*, 11, 247-274.

(52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R.R., Costa, D.L. and Schaich, K.M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(53) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795-801.

(54) Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35-44.

(55) Phelps, J.B., Garriott, M.L., and Hoffman, W.P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103-112.

(56) Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to »Report from the *in vitro* micronucleus assay working group«, *Mutation Res.*, 564, 97-100.

(57) Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61-65.

(58) Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1-3.

(59) Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169-184.

(60) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191-201.

▼**M3**

(61) Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(62) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269-275.

(63) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241-247.

(64) Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65-75.

(65) Hoffman, W.P., Garriott, M.L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 463-467.

(66) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 850/2004 af 29. april 2004 om persistente organiske miljøgifte og om ændring af direktiv 79/-117/EØF, EUT L 158 af 30.4.2004, s. 7.

▼M3

*Tillæg 1*

**Definitioner**

*Aneugen:* Alle stoffer eller processer, der ved interaktion med komponenterne i den mitotiske og meiotiske celledelingscyklus forårsager aneuploidi i celler eller organismer.

*Aneuploidi:* Enhver afvigelse fra det normale diploide (eller haploide) kromosomtal af et eller flere kromosomer, men ikke af et eller flere komplette kromosomsæt (polyploidi)

*Apoptose:* Programmeret celledød karakteriseret ved en række trin, der forårsager opløsning af celler i membranbundne partikler, som herefter elimineres ved fagocytose eller afstødning.

*Celleproliferation:* Forøgelse af celleantal som følge af mitotisk celledeling

*Centromer:* Dna-region af et kromosom, hvor begge kromatider holdes sammen, og hvorpå begge kinetokorer er bundet side om side.

*Klastogen:* Alle stoffer eller processer, der forårsager strukturelle kromosomaberrationer i populationer af celler eller organismer.

*Cytokinese:* Celledeling umiddelbart efter mitose, hvorved der dannes to datterceller, som hver indeholder en enkelt kerne.

*Proliferationsindeks for cytokineseblokerende stof (CBPI):* Andelen af celler efter anden deling i den behandlede population i forhold til den ubehandlede kontrol (se formlen i tillæg 2).

*Cytostase:* Hæmning af cellevækst (se formlen i tillæg 2)

*Cytotoksicitet:* Skadelige virkninger i cellestruktur eller -funktion, der i sidste ende forårsager celledød.

*Genotoksisk:* Et generelt udtryk, der omfatter alle former for dna- eller kromosombeskadigelse, herunder brud, omlejring af addukter, mutationer, kromosomaberrationer og aneuploidi. Det er ikke alle former for gentoksiske virkninger, der forårsager mutationer eller stabil kromosomskade.

*Interfaseceller:* Celler, der ikke er i mitosefase.

*Kinetokor:* En proteinstruktur, der er samlet ved et kromosoms centromer, hvortil tentrådene er påhæftet under celledeling, således at datterkromosomerne kan ordnes i forhold til dattercellernes poler.

*Mikrokerner:* Små ekstrakerner, der er adskilt fra cellens hovedkerne, og som dannes under mitosens eller meiosens telofase ud fra efterladte kromosomfragmenter eller hele kromosomer.

*Mitose:* Deling af cellekernen, der normalt inddeles i profase, prometafase, metafase, anafase og telofase.

*Mitoseindeks:* Forholdet mellem antallet af celler i metafase og det samlede antal celler i en population; det viser populationens celleformeringsgrad.

*Mutagen:* Forårsager arvelige ændringer af dna-baseparsekvens(er) i gener eller i kromosomstrukturen (kromosomaberrationer).

▼**M3**

*Non-disjunction:* Forbundne kromatiders manglende evne til at dele sig og spalte sig korrekt til dattercellerne under udvikling, hvorved der dannes datterceller med anormale kromosomtal.

*Polyploidi:* Numeriske kromosomaberrationer i celler eller organismer, der involverer et eller flere komplette kromosomsæt, men ikke et enkelt kromosom eller kromosomer (aneuploidi).

*Proliferationsindeks (PI):* Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2)

*Relativ forøgelse af celletal (RICC):* Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2).

*Relativ populationsfordobling (RPD):* Metode til måling af cytotoksicitet, hvis der ikke anvendes cytoB (se formlen i tillæg 2).

*Replikationsindeks (RI):* Andelen af afsluttede celledelingscyklusser i den behandlede kultur i forhold til den ubehandlede kontrol i eksponerings- og restitutionsfasen (se formlen i tillæg 2).

*Testkemikalie (eller teststof):* Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M3

*Tillæg 2*

**Formler for vurdering af cytotoksicitet**

1. *Hvis cytoB anvendes*, baseres evalueringen af cytotoksicitet på proliferationsindekset for cytokineseblokerende stof (CBPI) eller replikationsindekset (RI) (16) (58). CBPI angiver det gennemsnitlige antal cellecyklusser pr. celle under eksponeringen for cytoB og kan anvendes til at beregne celleproliferationen. RI angiver det relative antal kerner i behandlede kulturer sammenholdt med kontrolkulturerne og kan anvendes til at beregne cytostase i procent.

$$\% \text{ cytostase} = 100 - 100\{(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)\}$$

og:

T = kultur til behandling af testkemikalier

C = kultur til vehikelkontrol

hvor:

$$CBPI = \frac{((\text{antal mononukleære celler}) + (2 \times \text{antal binukleære celler}) + (3 \times \text{antal multinukleære celler}))}{(\text{antal celler i alt})}$$

Et CBPI på 1 (alle celler er mononukleære) svarer til en cytostase på 100 %.

$$\text{Cytostase} = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{antal binukleære celler}) + (2 \times \text{antal multinukleære celler})) \div (\text{antal celler i alt})_T}{((\text{antal binukleære celler}) + (2 \times \text{antal multinukleære celler})) \div (\text{antal celler i alt})_C} \times 100$$

T = behandlede kulturer

C = kontrolkulturer

2. Et RI på 53 % angiver således, at i forhold til antallet af celler, der delte sig til binukleære og multinukleære celler i kontrolkulturen, var der kun 53 % af disse celler, der delte sig i den behandlede kultur, dvs. 47 % cytostase.

3. *Hvis cytoB ikke anvendes*, anbefales evaluering af cytotoksicitet baseret på relativ forøgelse af celletal (RICC) eller relativ populationsfordobling (RPD) (58), da der ved begge metoder tages højde for den andel af cellepopulationen, som har delt sig.

$$RICC = \frac{(\text{forøgelse af antallet af celler i behandlede kulturer (til slut — i starten)})}{(\text{forøgelse af antallet af celler i kontrolkulturer (til slut — i starten)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{antal populationsfordoblinger i behandlede kulturer})}{(\text{antal populationsfordoblinger i kontrolkulturer})} \times 100$$

▼**M3**

hvor:

Populationsfordobling = [log (celleantal efter behandling ÷ oprindeligt celleantal)] ÷ log 2

4. Et RICC eller RPD på 53 % angiver således 47 % cytotoksicitet/cytostase.

5. Ved anvendelse af et proliferationsindeks (PI) kan cytotoksiciteten vurderes ved optælling af antallet af kloner med 1 celle (cl1), 2 celler (cl2), 3-4 celler (cl4) og 5-8 celler (cl8).

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI er også blevet anvendt som et værdifuldt og pålideligt cytotoksicitetsparameter for cellelinjer dyrket in situ uden cytoB (25) (26) (27) (28).

▼M3

*Tillæg 3*

**Anbefalede referencekemikalier til vurdring af ydeevne** ([1])

| Kategori | Kemikalie | CAS-nr. | EF-nr. |
|---|---|---|---|
| 1. Aktive klastogener uden metabolisk aktivering | | | |
| | Cytosinarabinosid | 147-94-4 | 205-705-9 |
| | Mitomycin C | 50-07-7 | 200-008-6 |
| 2. Klastogener, som kræver metabolisk aktivering | | | |
| | Benzo(a)pyren | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | Cyclofosfamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| 3. Aneugener | | | |
| | Colchicin | 64-86-8 | 200-598-5 |
| | Vinblastin | 143-67-9 | 205-606-0 |
| 4. Negative stoffer | | | |
| | Di-(2-ethylhexyl)phthalat | 117-81-7 | 204-211-0 |
| | Nalidixinsyre | 389-08-2 | 206-864-7 |
| | Pyren | 129-00-0 | 204-927-3 |
| | Natriumchlorid | 7647-14-5 | 231-598-3 |

([1]) Referencekemikalierne er de anbefalede kemikalier. Det er muligt at tilføje eller erstatte kemikalier på listen over referencekemikalier, hvis deres aktivitet er kendt, og hvis de inducerer mikrokerner ved hjælp af de samme mekanismer, og hvis det påvises, at de er egnede for de kemikalier, som skal testes ved hjælp af MNvit-assayet. Afhængigt af formålet kan begrundelsen også omfatte en valideringsundersøgelse af en bred vifte af stoffer eller en undersøgelse med fokus på et snævrere spektrum baseret på teststoffets kemiske gruppe eller de undersøgte skadevirkninger.

▼M3

B.50. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: DA**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) (B.42) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429), er blevet revideret (1). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA anvendes radioisotopisk thymidin eller jod til måling af lymfocytproliferation, og assayet har derfor begrænset anvendelse, når fremstilling, anvendelse eller bortskaffelse af radioaktivitet er problematisk. LLNA: DA (udviklet af Daicel Chemical Industries, Ltd.) er en ikkeradioaktiv modificering af LLNA, der kvantificerer adenosintrifosat (ATP)-indholdet ved hjælp af bioluminescens som indikator for lymfocytproliferation. LLNA: DA-testmetoden er blevet valideret og gennemgået og anbefales af et internationalt peer review-panel, der vurderer, at metoden med visse begrænsninger kan anvendes til at udpege hudsensibiliserende og ikkehudsensibiliserende kemikalier (10) (11) (12) (13). TM'en anvendes til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I kapitel B.6 i dette bilag og i OECD Test Guideline 406 anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehler-testen (14). LLNA (kapitel B.42 i dette bilag, OECD Test Guideline 429) og de to ikkeradioaktive modificeringer, LLNA: DA (kapitel B.50 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 A) og LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 B), har alle en fordel frem for marsvine-testene i B.6 og OECD Test Guideline 406 (14) med hensyn til begrænsning og forfinelse af anvendelsen af dyr.

2. I lighed med LLNA består LLNA: DA i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Evnen til at påvise hudsensibiliserende stoffer uden at det er nødvendigt at anvende dna-radioaktivt mærkede stoffer, fjerner risikoen for erhvervsmæssig eksponering for radioaktivitet og imødegår problemer med bortskaffelse af affald. Det kan skabe grundlag for øget anvendelse af mus til påvisning af hudsensibiliserende stoffer, hvilket vil mindske anvendelsen af marsvin til test for potentiale for hudsensibilisering (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (14).

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA: DA er en modificeret LLNA-metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier med bestemte begrænsninger. Det indebærer ikke nødvendigvis, at LLNA: DA altid skal anvendes i stedet for LLNA eller marsvinetest (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (14), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ, for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse (10) (11). Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om

▼M3

teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i betragtning ved vurderingen af, om LLNA: DA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA: DA [se punkt 5]) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA: DA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske antallet af dyr til dette formål i forhold til marsvinetest (B.6, OECD Test Guideline 406) (14). LLNA: repræsenterer desuden en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på, idet LLNA: DA i modsætning til B.6 og OECD Test Guideline 406 ikke kræver, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. På trods af LLNA: DA-metodens fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (14) er der visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige, f.eks. test af visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (6) (1 og kapitel B.42 i dette bilag) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (16), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406 (14). Det anbefales, at de begrænsninger, der er blevet identificeret for LLNA (1 og kapitel B.42 i dette bilag), ligeledes finder anvendelse for LLNA: DA (10). Derudover er det muligvis ikke hensigtsmæssig at anvende LLNA: DA til test af stoffer, der påvirker ATP-niveauet (f.eks. stoffer, der fungerer som ATP-inhibitorer), eller stoffer der påvirker den nøjagtige måling af intracellulær ATP (f.eks. forekomst af ATP-nedbrydende enzymer, forekomst af ekstracellulær ATP i lymfeknuden). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA: DA kunne anvendes til testning af alle stoffer, medmindre disse stoffer har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA: DA-metodens nøjagtighed. Der skal desuden tages hensyn til muligheden for tvetydige positive resultater ved stimulationsindeks (SI)-værdier på mellem 1,8 og 2,5 (se punkt 31-32). Dette er baseret på valideringsdatabasen over 44 stoffer med et SI på 1,8 eller derover (se punkt 6), for hvilke LLNA: DA identificerede alle 32 LLNA-sensibiliserende stoffer korrekt, men identificerede tre ud af 12 LLNA-ikkesensibiliserende stoffer med SI-værdier på mellem 1,8 og 2,5 (dvs. tvetydige positive resultater) forkert (10). Da det samme datasæt blev anvendt til fastsættelse af SI-værdierne og beregning af testens prædiktionsevne, kan de anførte resultater imidlertid være en overvurdering af den reelle prædiktionsevne.

TESTMETODENS PRINCIP

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA: DA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og

▼M3

proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst 1,8, før teststoffet kan vurderes nærmere som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af måling af ATP-indhold ved hjælp af bioluminescens (vides at korrelere med antal levende celler) (17) til måling af øget celleproliferation i de drænende aurikulære lymfeknuder (18) (19). Ved bioluminescensmetoden anvendes luciferaseenzymet til at katalysere dannelsen af lys fra ATP og luciferin på grundlag af følgende reaktion:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + lys$$

Den udsendte lysintensitet er lineært forbundet til ATP-koncentrationen og måles ved hjælp af et luminometer. Luciferin-luciferaseassayet er en følsom metode til kvantificering af ATP, der benyttes til en lang række formål (20).

BESKRIVELSE AF ASSAYET

**Valg af dyreart**

7. Mus må foretrækkes til denne test. Valideringsundersøgelser for LLNA: DA blev udelukkende udført med CBA/J-stammen, som derfor betragtes som den foretrukne stamme (12) (13). Der anvendes unge voksne hunmus, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i LLNA: DA-respons.

**Miljøbetingelser og fodring**

8. Mus bør anbringes i grupper (21), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

**Forberedelse af dyrene**

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

**Fremstilling af forsøgsopløsninger**

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

▼M3

**Pålidelighedskontrol**

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed på et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. DA. Det anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA: DA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 1,8 større end i den negative kontrolgruppe. PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 10 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 101-86-0) og 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA: DA (dvs. udfører LLNA: DA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA: DA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en ændring af LLNA: DA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (22).

▼M3

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (23). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type stoffers potentiale for hudsensibilisering. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA: DA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

TESTPROCEDURE

**Antal dyr og dosisniveauer**

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning (2) og (24). Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (24) (25). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), N,N-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (6), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

▼M3

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 33). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppen, når der indsamles data for de enkelte dyr (22). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Regelmæssig indsamling af data for de enkelte dyr øger dyrevelfærden, idet man undgår gentagelse af forsøg, som ville være nødvendige, hvis tilsynsmyndigheder på et senere tidspunkt stiller andre krav til de teststofresultater, der oprindeligt blev indsamlet på én måde (f.eks. på grundlag af poolede data for dyr), (f.eks. krav om data for de enkelte dyr).

**Prescreening**

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA: DA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA: DA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA: DA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 8). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (25). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis), på dag 7 (24 timer før afslutning) og på dag 8. På dag 8 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på $\geq$ 3 og/eller en forøgelse af øretykkelsen på $\geq$ 25 % på måledagen (26) (27). Den højeste dosis i LLNA: DA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

*Tabel 1*

**Erytemscorer**

| Observation | Score |
|---|---|
| Intet erytem | 0 |
| Meget let erytem (knapt diagnosticerbart) | 1 |
| Veldefineret erytem | 2 |

▼M3

| Observation | Score |
|---|---|
| Moderat til svært erytem | 3 |
| Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet | 4 |

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (26) (27) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (30) (31) (32) (33) (34).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (35), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA: DA-hovedundersøgelsen: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 8 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (36).

**Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen**

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 1 % natriumlaurylsulfat (SLS) i form af en vandig opløsning ved hjælp af en børste dyppet i SLS-opløsningen, således at hele dorsum af hvert øre dækkes med fire til fem strøg. En time efter SLS-behandlingen påføres dorsum af hvert øre 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15)

— *Dag 2, 3 og 7:* Proceduren fra dag 1 for forbehandling med 1 % SLS-vandopløsningen og påføring af teststoffet gentages.

— *Dag 4, 5 og 6:* Ingen behandling.

— *Dag 8:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Ca. 24-30 timer efter påføringen på dag 7 aflives dyrene humant. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og behandles særskilt i en phosphatbufferet saltopløsning (PBS) for hvert dyr. Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (22). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

▼M3

**Fremstilling af cellesuspensioner**

26. Fra hver mus fremstilles en bilateralt eksciseret enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC) ved at anbringe lymfeknuderne mellem to objektglas og påføre et let tryk for at knuse knuderne. Når det er konstateres, at vævet er blevet spredt ud i et tyndt lag, adskilles de to objektglas. Vævet på begge objektglas opslæmmes i PBS ved at holde hvert objektglas i vinkel over petriskålen og rense det med PBS, samtidigt med at vævet skrabes af objektglasset med en celleskraber. Lymfeknuder i negative kontroldyr er desuden små, så det er vigtigt, at de håndteres forsigtigt for at undgå en kunstig indvirkning på SI-værdier. Der anvendes en samlet volumen på 1 ml PBS til rensning af begge objektglas. LNC-suspensionen i petriskålen homogeniseres let med celleskraberen. Der udtages en 20 µL-prøve af LNC-suspensionen med en mikropipette, idet det sikres, at den synlige membran ikke udtages, og prøven blandes herefter med 1,98 ml PBS til fremstilling af en 2 ml-prøve. Der fremstilles herefter en ny 2 ml-prøve efter samme metode, således at der fremstilles to prøver for hvert dyr.

**Bestemmelse af celleproliferationen (måling af ATP-indholdet i lymfocytter)**

27. Forøgelser af ATP-indholdet i lymfeknuder måles ved hjælp af luciferin/luciferasemetoden med et ATP-målekit, der måler bioluminescens i relative lysenheder (RLU). Testperioden fra tidspunktet for aflivning af dyret til måling af ATP-indholdet for hvert enkelt dyr skal være ens og ligge inden for ca. 30 minutter, da det vurderes, at ATP-indholdet reduceres gradvist efter aflivning af dyret (12). Procedurerne fra ekscision af aurikulære lymfeknuder til måling af ATP skal således afsluttes inden for 20 minutter på grundlag af en forud fastlagt tidsplan, der gælder for alle dyr. ATP-luminescensen måles i hver 2 ml-prøve, således at der indsamles i alt to ATP-målinger for hvert dyr. Den gennemsnitlige ATP-luminescens måles herefter og anvendes i efterfølgende beregninger (se punkt (30).

OBSERVATIONER

**Kliniske observationer**

28. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (36).

**Kropsvægt**

29. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

30. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som den gennemsnitlige SI-værdi. SI-værdien fås ved at dividere den gennemsnitlige RLU/mus i hver stoftestgruppe og PC-gruppen med den gennemsnitlige RLU/mus for opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1.

▼M3

31. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 1,8 (10) Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat (dvs. en SI-værdi på mellem 1,8 og 2,5) anses for at være positivt (2) (3) (37).

32. I tilfælde af tvetydige resultater med en SI på mellem 1,8 og 2,5 vil det være hensigtsmæssigt at tage højde for yderligere oplysninger som f.eks. dosis-responsforholdet, dokumentation for systemisk toksicitet eller for stærk irritation og i påkommende tilfælde statistisk signifikans sammen med SI-værdierne for at få bekræftet, at disse resultater er positive (10). Teststoffets forskellige egenskaber bør ligeledes tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (4).

33. Indsamling af data for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolgrupper). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

34. Data opstilles i tabelform med angivelse af det enkelte dyrs RLU-værdier, gruppens gennemsnitlige RLU/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppe.

**Testrapport**

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel

▼**M3**

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— oprindelse, batchnummer og producentens oplysninger om kvalitetssikring/kvalitetskontrol for ATP-kittet

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— tidspunktet for aflivning af dyr og tidspunktet for måling af ATP for hvert dyr

— en tabel med RLU-værdier for de enkelte mus og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for RLU/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe

▼M3

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol*., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol*., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol*., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [ http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol*., 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol*., 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth*., 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth*., 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol*., 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol*., 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol*., 93, 13-31.

(25) OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol*., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol*., 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol*., 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol*., 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect*., 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

*Nøjagtighed:* Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (38).

*Referencestof:* Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

*Falsk negativ:* Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt.

*Falsk positiv:* Et stof, som ved en test fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt.

*Fare:* Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

*Reproducerbarhed mellem laboratorier:* Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (38).

*Reproducerbarhed inden for laboratorier:* Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (38).

*Outlier:* En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

*Kvalitetssikring:* En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

*Pålidelighed:* Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (38).

*Hudsensibilisering:* En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

*Stimulationsindeks (SI):* En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

*Teststof (eller testkemikalie):* Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M3

B.51. **HUDSENSIBILISERING: ASSAY PÅ LOKALE LYMFEKNUDER: BrdU-ELISA**

INDLEDNING

1. OECD's vejledning om testning af kemikalier og EU-testmetoder bliver med mellemrum gennemgået på baggrund af den videnskabelige udvikling, behovet for ny lovgivning og hensynet til dyrevelfærden. Den oprindelige testmetode (TM) (B.42) til bestemmelse af hudsensibilisering i mus, assay på lokale lymfeknuder (LLNA, OECD Test Guideline 429), er blevet revideret (1 og kapitel B.42 i dette bilag). En validering af LLNA og en oversigt over det tilknyttede arbejde findes i litteraturen (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). I LLNA anvendes radioisotopisk thymidin eller jod til måling af lymfocytproliferation, og assayet har derfor begrænset anvendelse, når fremstilling, anvendelse eller bortskaffelse af radioaktivitet er problematisk. LLNA: BrdU-ELISA [Enzyme-Linked Immunosorbent Assay] er en ikke radioaktiv modificering af LLNA-TM, der anvender ikkeradioaktivt mærket 5-brom-2-deoxyuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS-] nr. 59-14-3) i et ELISA-baseret testsystem til måling af lymfocytproliferation. LLNA: BrdU-ELISA er blevet valideret og gennemgået og anbefales af et internationalt uafhængigt peer review-panel, der vurderer, at metoden med visse begrænsninger kan anvendes til at udpege hudsensibiliserende og ikkehudsensibiliserende kemikalier (10) (11) (12). TM'en anvendes til vurdering af kemikaliers (stoffer og blandinger) potentiale for hudsensibilisering i dyr. I kapitel B.6 i dette bilag og i OECD Test Guideline 406 anvendes marsvin, navnlig maksimeringstesten på marsvin og Buehlertesten (13). LLNA (kapitel B.42 i dette bilag, OECD Test Guideline 429) og de to ikkeradioaktive modificeringer, LLNA: BrdU-ELISA (kapitel B.51 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 B) og LLNA: DA (kapitel B.50 i dette bilag, OECD Test Guideline 442 A), har alle en fordel frem for marsvinetestene i B.6 og OECD Test Guideline 406 (13) med hensyn til begrænsning og forfinelse af anvendelsen af dyr.

2. I lighed med LLNA består LLNA: BrdU-ELISA i undersøgelse af induktionsfasen i hudsensibilisering og giver kvantitative data, som er velegnede til at vurdere dosis/responsforholdet. Evnen til at påvise hudsensibiliserende stoffer uden at det er nødvendigt at anvende dna-radioaktivt mærkede stoffer, fjerner risikoen for erhvervsmæssig eksponering for radioaktivitet og imødegår problemer med bortskaffelse af affald. Det kan skabe grundlag for øget anvendelse af mus til påvisning af hudsensibiliserende stoffer, hvilket kan mindske anvendelsen af marsvin til test for potentiale for hudsensibilisering (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13).

DEFINITIONER

3. De anvendte definitioner er forklaret i tillæg 1.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. LLNA: BrdU-ELISA er en modificeret LLNA-metode til at udpege potentielle hudsensibiliserende kemikalier med bestemte begrænsninger. Det indebærer ikke nødvendigvis, at LLNA: BrdU-ELISA altid skal anvendes i stedet for LLNA eller marsvinetest (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406) (13), men snarere, at dette assay er lige så nyttigt og kan anvendes som et alternativ, for hvilket det gælder, at positive og negative resultater sædvanligvis ikke længere kræver yderligere bekræftelse (10) (11). Testlaboratoriet bør inden forsøgets udførelse gennemgå alle foreliggende oplysninger om

▼M3

teststoffet. Sådanne oplysninger omfatter stoffets identitet og kemiske struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af eventuelle andre in vivo- og in vitro-toksicitetsundersøgelser af teststoffet og toksikologiske data for strukturelt beslægtede kemikalier. Disse oplysninger bør tages i betragtning ved vurderingen af, om LLNA: BrdU-ELISA er egnet til brug for stoffet (i lyset af begrænsede typer kemikaliers inkompatibilitet med LLNA: BrdU-ELISA [se punkt 5]) og som støtte ved valg af dosis.

5. LLNA: BrdU-ELISA er en in vivo-metode og eliminerer således ikke brugen af dyr til vurdering af allergisk kontaktsensibiliserende aktivitet. Den giver imidlertid mulighed for at mindske antallet af dyr til dette formål i forhold til marsvinetest (B.6, OECD Test Guideline 406) (13). LLNA: BrdU-ELISA repræsenterer desuden en væsentligt mere sofistikeret måde (mindre smerte og angst) at anvende dyr til allergisk kontaktsensibiliseringstest på, idet LLNA: BrdU-ELISA i modsætning til B.6 og OECD Test Guideline 406 ikke kræver, at der fremkaldes challenge-inducerede dermale hypersensivitetsreaktioner. Desuden kræver LLNA: BrdU-ELISA ikke anvendelse af et adjuvans, således som det er tilfældet for maksimeringstesten på marsvin (kapitel B.6 i dette bilag, 13). LLNA: BrdU-ELISA mindsker således dyrenes lidelser. På trods af LLNA: BrdU-ELISA-metodens fordele frem for B.6 og OECD Test Guideline 406 (13) er der visse begrænsninger, som kan gøre B.6 eller OECD Test Guideline 406 nødvendige, f.eks. test af visse metaller, falsk positive resultater for visse hudirriterende stoffer [såsom visse overfladeaktive kemikalier] (6) (1) og kapitel B.42 i dette bilag) eller teststoffets opløselighed). Kemiske stofgrupper eller stoffer, der indeholder funktionelle grupper, som kan skabe uafklarede sammenhænge (confounders) (15), kan desuden gøre marsvinetest nødvendige (dvs. B.6, OECD Test Guideline 406 (13)). Det anbefales, at de begrænsninger, der er blevet identificeret for LLNA (1 og kapitel B.42 i dette bilag), ligeledes finder anvendelse for LLNA: BrdU-ELISA (10). Bortset fra disse identificerede begrænsninger bør LLNA: BrdU-ELISA kunne anvendes til testning af alle kemikalier, medmindre disse kemikalier har egenskaber, som kan have indflydelse på LLNA: BrdU-ELISA-metodens nøjagtighed. Der skal desuden tages hensyn til muligheden for tvetydige positive resultater ved stimulationsindeks (SI)-værdier på mellem 1,6 og 1,9 (se punkt 31-32). Dette er baseret på valideringsdatabasen over 43 stoffer med et SI på 1,6 eller derover (se punkt 6), for hvilke LLNA: BrdU-ELISA identificerede alle 32 LLNA-sensibiliserende stoffer korrekt, men identificere tre ud af 11 LLNA-ikkesensibiliserende stoffer med SI-værdier på mellem 1,6 og 1,9 (dvs. tvetydige positive resultater) (10) forkert. Da det samme datasæt blev anvendt til fastsættelse af SI-værdierne og beregning af testens prædiktionsevne, kan de anførte resultater imidlertid være en overvurdering af den reelle prædiktionsevne.

TESTMETODENS PRINCIP

6. Det tilgrundliggende princip for LLNA: BrdU-ELISA består i, at den sensibiliserende agens inducerer en lymfocytproliferation i de lymfeknuder, som dræner påføringsstedet for teststoffet. Denne proliferation er proportional med den påførte dosis og med allergenets styrke og gør det let at få et kvantitativt mål for sensibiliseringen. Proliferationen måles ved at sammenholde den gennemsnitlige proliferation i hver forsøgsgruppe med den gennemsnitlige proliferation i vehikelkontrolgruppen (VC-gruppen). Forholdet mellem den gennemsnitlige proliferation i den enkelte behandlingsgruppe og proliferationen i den sideløbende VC-gruppe kaldes stimulationsindekset (SI) og skal være mindst 1,6, før teststoffet kan

▼M3

vurderes nærmere som en potentielt hudsensibiliserende agens. De her beskrevne metoder bygger på anvendelse af måling af BrdU-indholdet til måling af øget celleproliferation i de drænende aurikulære lymfeknuder. BrdU er beslægtet med thymidin og er ligeledes inkorporeret i dna-cellerne under formering. Inkorporeringen af BrdU måles ved hjælp af ELISA, der anvender et BrdU-specifikt antistof, som også mærkes med peroxydase. Når substratet tilsættes, reagerer peroxydasen med substratet og der frembringes et farvet produkt, som kvantificeres ved en bestemt absorbans ved hjælp af en mikrotiterpladeaflæser.

BESKRIVELSE AF ASSAYET

**Valg af dyreart**

7. Mus må foretrækkes til denne test. Valideringsundersøgelser for LLNA: BrdU-ELISA blev udelukkende udført med CBA/JN-stammen, som derfor betragtes som den foretrukne stamme (10) (12). Der anvendes unge voksne hunmus, som ikke har født og ikke er drægtige. Ved forsøgets begyndelse skal dyrene være 8-12 uger gamle, og vægtvariationen mellem de anvendte dyr skal være mindst mulig og må ikke overstige 20 % af gennemsnitsvægten. Alternativt kan der anvendes andre stammer og handyr, når der er genereret tilstrækkelige data til at dokumentere, at der ikke er væsentlige stamme- og/eller kønsspecifikke forskelle i BrdU-ELISA-respons.

**Miljøbetingelser og fodring**

8. Mus bør anbringes i grupper (16), medmindre der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for at holde dem i hvert sit bur. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af lokalet, men 50-60 % skal tilsigtes. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke. Som foder kan anvendes sædvanligt laboratoriefoder med fri adgang til drikkevand.

**Forberedelse af dyrene**

9. Dyrene udtages på tilfældig måde, mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres (men ikke med nogen form for øremærkning), og holdes i burene i mindst fem døgn forud for doseringen, så de kan akklimatisere sig til forsøgsbetingelserne. Før behandlingen påbegyndes, undersøges alle dyr for at sikre, at de er uden observerbare hudlæsioner.

**Fremstilling af forsøgsopløsninger**

10. Faste stoffer opløses eller opslæmmes i opløsningsmidler/bærestoffer og fortyndes eventuelt inden påføring på musens øre. Flydende kemikalier kan enten gives ufortyndet eller fortyndes først. Uopløselige kemikalier såsom dem, der generelt anvendes i medicinsk udstyr, underkastes en stor ekstraktion med passende opløsningsmiddel for at afdække alle ekstraherbare bestanddele til testning inden påføring på musens øre. Teststofferne fremstilles dagligt, medmindre stabilitetsdata viser, at opbevaring er acceptabel.

**Pålidelighedskontrol**

11. Positive kontrolstoffer (PC) anvendes til at godtgøre, at assayets præstationer er tilstrækkelige ved at reagere med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed som et sensibiliserende teststof, hvor responsens størrelsesorden er velkarakteriseret. Det anbefales at anvende sideløbende positiv kontrol, fordi det godtgør, at laboratoriets kompetence er tilstrækkelig til, at assayet bliver vellykket, og gør det muligt at bedømme reproducerbarheden og sammenligneligheden inden for og mellem laboratorier. Nogle tilsynsmyndigheder stiller desuden krav om en positiv kontrol for den enkelte undersøgelse, og brugere opfordres derfor til at henvende sig til de relevante myndigheder inden udførelsen af LLNA. BrdU-ELISA. Det

▼M3

anbefales derfor at foretage sideløbende positiv kontrol regelmæssigt, således at der ikke bliver behov for yderligere dyreforsøg for at opfylde eventuelle krav ved regelmæssig brug af positiv kontrol (se punkt 12). Den positive kontrol skal fremkalde en positiv LLNA: BrdU-ELISA-respons ved det eksponeringsniveau, som forventes at give en stigning i SI, som er mere end 1,6 større end i den negative kontrolgruppe). PC-dosis vælges, således at den ikke forårsager for stærk hudirritation eller systemisk toksicitet, og således at induktionen er reproducerbar, men ikke for voldsom (dvs. et SI på > 14 er for højt). De foretrukne positive kontrolstoffer er 25 % hexylkanelaldehyd (CAS-nr. 101-86-0) og 25 % eugenol (CAS-nr. 97-53-0) i acetone: olivenolie (4:1, v/v). Under visse omstændigheder vil andre positive kontrolstoffer, der opfylder de ovennævnte kriterier, kunne anvendes, såfremt valget heraf kan begrundes.

12. Selv om det anbefales at anvende en sideløbende PC-gruppe, kan der være situationer, hvor regelmæssig testning (dvs. med ≤ 6 måneders interval) af det positive kontrolstof kan være tilstrækkeligt for laboratorier, der jævnligt udfører LLNA: BrdU-ELISA (dvs. udfører LLNA: BrdU-ELISA mindst én gang om måneden) og har oprettet en historisk PC-database, der påviser laboratoriets evne til at skabe reproducerbare og nøjagtige resultater med positive kontroller. Laboratoriet kan påvise, at det har tilstrækkelig kompetence til at udføre LLNA: BrdU-ELISA ved at opnå sammenhængende og positive resultater med den positive kontrol i mindst 10 uafhængige forsøg udført inden for en rimelig periode (dvs. inden for et år).

13. Der skal altid anvendes en sideløbende PC-gruppe i tilfælde af en procedureændring af LLNA: BrdU-ELISA (f.eks. ændring af uddannet personale, ændring af testmaterialer og/eller reagenser, ændring af testudstyr, ændring af kildedyr), og disse ændringer skal dokumenteres i laboratorierapporter. Der skal tages hensyn til disse ændringers indvirkning på tilstrækkeligheden af den allerede oprettede historiske database, når det besluttes, om det er nødvendigt at oprette en ny historisk database for at dokumentere, at PC-resultaterne er sammenhængende.

14. Forsøgslederen skal være opmærksom på, at afgørelsen om at udføre en PC-undersøgelse regelmæssigt i stedet for samtidigt har indflydelse på, om negative undersøgelsesresultater, der er opnået uden en sideløbende positiv kontrol i perioden mellem hver regelmæssige PC-undersøgelse, er tilstrækkelige og kan accepteres. Hvis der f.eks. opnås et falsk negativt resultat i den regelmæssige PC-undersøgelse, kan negative testresultater, der er opnået i perioden mellem den seneste godkendte PC-undersøgelse og den ikke godkendte regelmæssige PC-undersøgelse, drages i tvivl. Disse konsekvenser bør overvejes nøje, når det besluttes, om der skal udføres sideløbende positive kontroller, eller om der kun skal udføres regelmæssige positive kontroller. Det skal også overvejes at anvende færre dyr i den sideløbende PC-gruppe, når det er videnskabeligt begrundet, og hvis laboratoriet på grundlag af laboratoriespecifikke historiske data påviser, at der kan anvendes færre mus (17).

15. Skønt det positive kontrolstof bør afprøves i et vehikel, som vides at fremkalde ensartet respons (f.eks. acetone: olivenolie, 4:1, v/v), kan det i visse godkendelsessituationer desuden være nødvendigt med testning i andre vehikler end standardvehiklet (med en klinisk-kemisk relevant formulering) (18). Hvis den sideløbende positive kontrol foretages i et andet vehikel end teststoffet, skal der foretages en særskilt vehikelkontrol for den sideløbende positive kontrol.

▼M3

16. Ved vurdering af teststoffer af en specifik kemisk klasse eller responser kan referencestoffer også anvendes til at vise, at testmetoden kan anvendes til at påvise denne type teststoffers potentiale for hudsensibilisering korrekt. Egnede referencestoffer skal have følgende egenskaber:

— strukturel og funktionel lighed med den klasse, som det teststof, der testes, tilhører

— kendte fysisk/kemiske egenskaber

— støttedata fra LLNA: BrdU-ELISA

— støttedata fra andre dyremodeller og/eller fra mennesker.

TESTPROCEDURE

**Antal dyr og dosisniveauer**

17. Der anvendes mindst fire dyr i hver dosisgruppe, mindst tre forskellige koncentrationer af teststoffet, en sideløbende NC-gruppe, som udelukkende behandles med det til teststoffet anvendte vehikel, og en PC-gruppe (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15). Det bør overvejes at teste flere doser af det positive kontrolstof, navnlig ved periodisk testning af det positive kontrolstof. Bortset fra behandlingen med prøvestof behandles dyrene i kontrolgrupperne på samme måde som dyrene i behandlingsgrupperne.

18. Dosering og valg af vehikel baseres på anbefalingerne i henvisning 2 og 19. Dosisniveauerne vælges normalt af koncentrationsserier på 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % osv. Der skal der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale for valget af de anvendte koncentrationsserier. Alle foreliggende toksikologiske oplysninger (f.eks. vedrørende akut toksicitet og hudirritation) og strukturelle og fysisk-kemiske oplysninger om det pågældende teststof (og/eller strukturelt beslægtede stoffer) tages i betragtning, således at der vælges tre på hinanden følgende koncentrationer, hvoraf den højeste er den, der giver størst mulig eksponering uden systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation (19) (20 og kapitel B.4 i dette bilag). Såfremt disse oplysninger ikke foreligger, kan det være nødvendigt at foretage en prescreening (se punkt 21-24).

19. Vehiklet må ikke indvirke på eller fordreje testresultatet og vælges, således at testkoncentrationer og opløselighed maksimeres, samtidig med at den fremstillede opløsning/suspension er egnet til påføring af tesstoffet. De anbefalede vehikler er acetone: olivenolie (4:1 v/v), *N,N*-dimethylformamid, methylethylketon, propylenglycol og dimethylsulphoxid (6), men andre kan anvendes, hvis der fremlægges et fyldestgørende videnskabeligt rationale derfor. I visse situationer kan det som yderligere kontrol være nødvendigt med et klinisk relevant opløsningsmiddel eller den formulering, hvori teststoffet markedsføres. Man må specielt være opmærksom på, at vehikelsystemet bør indeholde hydrofile teststoffer, som befugter huden og ikke straks løber af, ved at inkorporere egnede opløsningsmidler (f.eks. 1 % Pluronic® L92). Vehikler kun bestående af vand bør således undgås.

▼M3

20. Behandling af lymfeknuder fra hver enkelt mus gør det muligt at vurdere variationen mellem dyr indbyrdes og at foretage en statistisk sammenligning af forskellen mellem teststoffet og målinger af VC-gruppen (se punkt 33). Det er desuden muligt at vurdere muligheden for at reducere antallet af mus i PC-gruppe, når der indsamles data for de enkelte dyr (17). Nogle tilsynsmyndigheder stilles desuden krav om indsamling af data for de enkelte dyr. Regelmæssig indsamling af data for de enkelte dyr øger dyrevelfærden, idet man undgår gentagelse af forsøg, som ville være nødvendige, hvis tilsynsmyndigheder på et senere tidspunkt stiller andre krav til de teststofresultater, der oprindeligt blev indsamlet på én måde (f.eks. på grundlag af poolede data for dyr), (f.eks. krav om data for de enkelte dyr).

**Prescreening**

21. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelige oplysninger til at bestemme højeste dosis, der skal testes (se punkt 18), foretages en prescreening for at definere det passende dosisniveau, der skal testes i LLNA: BrdU-ELISA. Formålet med prescreeningen er at få hjælp til at vælge det maksimale dosisniveau, der skal anvendes i LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen, hvis der ikke foreligger oplysninger om den koncentration, der inducerer systemisk toksicitet (se punkt 24) og/eller for stærk lokal hudirritation (se punkt 23). Det maksimale dosisniveau, der testes, er 100 % af teststoffet for væsker eller den højest mulige koncentration for faste stoffer eller opslæmninger.

22. Prescreeningen foretages ved samme betingelser som for LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen, bortset fra at der ikke foretages en vurdering af lymfeknudeproliferationen, og der kan anvendes færre dyr til hver enkel dosisgruppe. Det foreslås at anvende et eller to dyr til hver enkel dosisgruppe. Alle mus observeres dagligt, og det registreres, om der optræder kliniske symptomer på systemisk toksicitet eller lokal irritation på påføringsstedet. Kropsvægten registreres inden forsøget og ved afslutning af forsøget (dag 6). Begge ører på de enkelte mus observeres for erytem, der registreres med en scoreværdi i tabel 1 (20 og kapitel B.4 i dette bilag). Der foretages målinger af øretykkelsen med en tykkelsesmåler (f.eks. et digitalt mikrometer eller en Peacock Dial-tykkelsesmåler) på dag 1 (inden administration af dosis), på dag 3 (ca. 48 timer efter den første dosis) og på dag 6. På dag 6 kan øretykkelsen desuden bestemmes ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse, der foretages, efter at dyrene er blevet humant aflivet. For stærk lokal hudirritation angives med en erytemscore på $\geq 3$ og/eller en forøgelse af øretykkelsen på $\geq 25$ % på måledagen (21) (22). Den højeste dosis i LLNA: BrdU-ELISA-hovedundersøgelsen skal være den næsthøjeste dosis i prescreeningskoncentrationsserien (se punkt 18), som ikke inducerer systemisk toksicitet og/eller for stærk lokal hudirritation.

*Tabel 1*

**Erytemscorer**

| Observation | Score |
|---|---|
| Intet erytem | 0 |
| Meget let erytem (knapt diagnosticerbart) | 1 |
| Veldefineret erytem | 2 |

▼M3

| Observation | Score |
|---|---|
| Moderat til svært erytem | 3 |
| Svært erytem (oksekødsfarvet) til escharadannelse, som umuliggør klassificering af erytemet | 4 |

23. Ud over en forøgelse af øretykkelsen på 25 % (21) (22) er en statistisk signifikant forøgelse af øretykkelsen hos de eksponerede mus sammenlignet med kontrolmusene også blevet anvendt til at identificere lokalirriterende stoffer i LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Selv om statistisk signifikante forøgelser kan forekomme, når øretykkelsen er under 25 %, er de ikke blevet specifikt forbundet med for stærk irritation (25) (26) (27) (28) (29).

24. Følgende kliniske observationer kan indikere systemisk toksicitet (30), hvis de anvendes som led i en integreret vurdering, og kan således indikere det maksimale dosisniveau, der kan anvendes i LLNA: BrdU-ELISA: ændringer i nervesystemets funktion (f.eks. hårrejsning, ataxi, rystelser og kramper), adfærdsændringer (f.eks. aggressivitet, ændringer i soigneringsaktiviteten, markant ændring i aktivitetsniveauet), ændringer i respirationsmønstre (f.eks. ændringer i respirationshyppigheden og -intensiteten såsom åndenød, snappende respiration og rallelyd) samt ændringer i føde- og vandindtagelsen. Derudover skal tegn på apati og/eller mangel på respons og kliniske tegn på lidelse og smerte, der ikke er let eller kortvarig, en reduktion af kropsvægten på > 5 % fra dag 1 til dag 6 og dødelighed tages i betragtning ved vurderingen. Dyr, som er moribunde, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, skal aflives humant (31).

**Forsøgsplanen for hovedundersøgelsen**

25. Forsøgsplanen for assayet er følgende:

— *Dag 1:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Dorsum af hvert øre påføres 25 µl af den pågældende teststofkoncentration, af vehiklet alene eller af det positive kontrolstof (sideløbende eller nylig, afhængigt af laboratoriets politik, jf. punkt 11-15).

— *Dag 2 og 3:* Påføringen fra dag 1 gentages.

— *Dag 4:* Ingen behandling.

— *Dag 5:* En opløsning på 0,5 ml (5 mg/mus) af BrdU (10 mg/ml) injiceres intraperitonealt.

— *Dag 6:* Hvert dyrs vægt bestemmes og registreres sammen med kliniske observationer. Ca. 24 timer (24 t) efter BrdU-injektionen aflives dyrene humant. De drænende aurikulære lymfeknuder fra hvert museøre eksciseres og behandles særskilt i en phosphatbufferet saltopløsning (PBS) for hvert dyr. Detaljer og diagrammer vedrørende identifikation og dissektion af lymfeknuder findes i henvisning (17). Der kan inkluderes yderligere parametre såsom bedømmelse af øreerythemscore eller målinger af øretykkelsen (foretages med en tykkelsesmåler eller ved hjælp af øremærkevægtbestemmelse ved obduktion) med henblik på yderligere kontrol af det lokale hudrespons i hovedundersøgelsen.

▼M3

**Fremstilling af cellesuspensioner**

26. Fra hver mus fremstilles en bilateralt eksciseret enkeltcellesuspension af lymfeknudeceller (LNC) ved forsigtig mekanisk disaggregering gennem 200 μm trådnet af rustfrit stål eller en anden acceptabel teknik til fremstilling af en enkeltcellesuspension (f.eks. anvendelse af en pistil i plast til engangsbrug til knusning af lymfeknuderne, der herefter ledes gennem en #70 nylonmaske). Proceduren for fremstilling af LNC-suspensionen er meget vigtig i dette assay, og alle operatører skal derfor sætte sig ind i denne procedure på forhånd. Lymfeknuder i negative kontroldyr er desuden små, så det er vigtigt at de håndteres forsigtigt for at undgå en kunstig indvirkning på SI-værdier. LNC-suspensionens målvolumen skal i hvert enkelt tilfælde justeres til en bestemt optimal volumen (ca. 15 ml). Den optimale volumen er baseret på opnåelsen af en gennemsnitlig absorbans for NC-gruppen, der ligger inden for intervallet 0,1- 0,2.

**Bestemmelse af celleproliferationen (måling af BrdU-indholdet i dna af lymfocytter)**

27. BrdU måles ved hjælp af ELISA med kommercielt kit (f.eks. Roche Applied Science, Mannheim, Germany, Catalogue Number 11 647 229 001). Kort beskrevet tilsættes 100 μl af LNC-suspensionen til hullerne i en fladbundet tredobbelt mikroplade. Efter fiksering og denaturering af LNC tilsættes anti-BrdU-antistof til hvert hul og henstår til reaktion. Anti-BrdU-antistoffet vaskes efterfølgende af, hvorefter substratopløsningen tilsættes og henstår til fremstilling af kromogen. Herefter måles absorbans ved 370 nm med en referencebølgelængde på 492 nm. Testbetingelserne skal altid optimeres (se punkt 26).

OBSERVATIONER

**Kliniske observationer**

28. Hver enkelt mus observeres omhyggeligt mindst en gang dagligt for alle kliniske tegn på lokalirritation på påføringsstedet eller systemisk toksicitet. Alle observationer registreres systematisk i enkeltjournaler for hver mus. Kontrolplaner skal omfatte kriterier for omgående identificering af de mus, der udviser systemisk toksicitet, for stærk lokal hudirritation eller hudætsning, og som skal aflives (31).

**Kropsvægt**

29. Som angivet i punkt 25 måles kropsvægten af hvert dyr ved forsøgets begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning.

BEREGNING AF RESULTATER

30. Resultaterne for hver behandlingsgruppe angives som den gennemsnitlige SI-værdi. SI-værdien fås ved at dividere det gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/mus i hver stoftestgruppe og PC-gruppen med det gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/mus for opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppen. Den gennemsnitlige SI-værdi for de vehikelbehandlede kontroldyr er således 1.

BrdU-mærkningsindekset defineres som:

$$\text{BrdU-mærkningsindeks} = (ABS_{em} - \text{ABS blank}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blank}_{ref})$$

Hvor: em = emissionsbølgelængde og ref = referencebølgelængde.

▼M3

31. I beslutningsprocessen anses et resultat for at være positivt, når SI er mindst 1,6 (10). Dosis/responsforholdets styrke, den statistiske signifikans og opløsningsmidlets/vehiklets og PC-responsets sammenhæng kan imidlertid også indgå i bedømmelsen af, om et tvetydigt resultat (dvs. en SI-værdi på mellem 1,6 og 1,9) anses for at være positivt (3) (6) (32).

32. I tilfælde af tvetydige resultater med en SI på mellem 1,6 og 1,9 vil det være hensigtsmæssigt at tage højde for yderligere oplysninger som f.eks. dosis-responsforholdet, dokumentation for systemisk toksicitet eller for stærk irritation og i påkommende tilfælde statistisk signifikans sammen med SI-værdierne for at få bekræftet, at disse resultater er positive (10). Teststoffets forskellige egenskaber bør ligeledes tages i betragtning, herunder om det er strukturelt beslægtet med kendte hudsensibiliserende stoffer, om det medfører for stærk lokal hudirritation hos musen, og arten af det iagttagne dosis-responsforhold. Disse og andre overvejelser er der redegjort mere indgående for andetsteds (4).

33. Indsamling af data om radioaktivitet for den enkelte mus gør det muligt at foretage en statistisk analyse af tilstedeværelsen og omfanget af dosis-responsforholdet i dataene. Statistiske vurderinger kan omfatte en evaluering af dosis-responsforholdet samt behørigt tilpassede sammenligninger af testgrupper (f.eks. parvis sammenligning af dosisgruppe og sideløbende (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolgrupper). Statistiske analyser kan omfatte f.eks. lineær regression eller Williams test til vurdering af dosis-responsudviklingen og Dunnetts test til parvis sammenligning. Ved valg af passende statistisk analysemetode bør undersøgeren være opmærksom på mulige forskelle i varians eller andre tilknyttede problemer, som kan kræve transformation af data eller anvendelse af ikkeparametrisk statistisk analyse. Undersøgeren kan under alle omstændigheder være nødsaget til at udføre SI-beregninger og statistiske analyser med og uden visse datapunkter (til tider kaldet »outliers«).

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

34. Data opstilles i tabelform med angivelse af de enkelte dyrs BrdU-mærkningsindeksværdier, gruppens gennemsnitlige BrdU-mærkningsindeks/dyr, det tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM), og det gennemsnitlige SI for hver dosisgruppe sammenholdt med den sideløbende opløsningsmiddel/vehikelkontrol-gruppe.

**Testrapport**

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Test- og kontrolstoffer:

— identifikationsoplysninger (f.eks. CAS- og EF-numre, hvis de findes, oprindelse, renhed, kendte urenheder, batchnummer)

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. flygtighed, stabilitet, opløselighed)

— for blandinger: sammensætning og relativt indhold af bestanddelene.

Opløsningsmiddel/bærestof:

— identifikationsoplysninger (renhed, koncentration (i givet fald), anvendt volumen)

— begrundelse for valg af vehikel

▼**M3**

For forsøgsdyrene:

— den anvendte CBA-musestamme

— dyrenes mikrobiologiske status, hvis den kendes

— antal dyr og deres alder

— dyrenes oprindelse, miljøbetingelser, kost osv.

Testbetingelser:

— oprindelse, batchnummer og producentens oplysninger om kvalitetssikring/kvalitetskontrol (antistoffets følsomhed og specificitet og påvisningsgrænsen) for ELISA-kittet

— nærmere oplysninger om præparation og påføring af teststoffet

— begrundelse af den valgte dosis (herunder resultaterne af prescreeningen, hvis en sådan er udført)

— anvendte koncentrationer af vehikel og teststof og samlet mængde påført teststof

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse).

— detaljeret beskrivelse af behandlings- og prøveudtagningsplan

— metoder til måling af toksicitet

— kriterier for bedømmelse af undersøgelsen som positiv eller negativ

— nærmere oplysninger om afvigelser fra protokollen og en redegørelse for, hvordan afvigelsen indvirker på undersøgelsens udformning og resultater.

Pålidelighedskontrol:

— sammenfatning af resultaterne af den seneste pålidelighedskontrol, herunder oplysninger om teststoffet og anvendt koncentration og vehikel

— data for sideløbende og/eller tidligere positive og sideløbende negative (opløsningsmiddel/bærestof) kontrolprøver fra prøvelaboratoriet

— hvis der ikke blev foretaget en sideløbende positiv kontrol, datoen for og laboratorierapport om den seneste regelmæssige positive kontrol og en rapport med nærmere historiske data for den positive kontrol fra laboratoriet, hvori det begrundes, hvorfor der ikke er blevet foretaget en sideløbende positiv kontrol.

Resultater:

— de enkelte mus' vægt ved doseringens begyndelse og ved den planmæssige humane aflivning samt det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for hver behandlingsgruppe

— tidspunkt for indtræden af og tegnene på toksicitet, herunder eventuel hudirritation på administrationsstedet for hvert dyr

— en tabel med mærkningsindekser for de enkelte mus og SI-værdier for hver behandlingsgruppe

— det gennemsnitlige og tilknyttede fejlled (f.eks. SD, SEM) for mærkningsindeks/mus for hver behandlingsgruppe og resultaterne af en outlieranalyse for hver behandlingsgruppe

▼M3

— beregnet SI og et passende mål for variationen, hvor der tages hensyn til variationen mellem dyr i både teststoffet og kontrolgrupperne

— dosis-responsforholdet

— statistiske analyser, når det er hensigtsmæssigt.

Behandling af resultater:

— Kortfattet kommentar til resultaterne, dosis-responsanalyse og i givet fald statistisk analyse med en konklusion med hensyn til, om det undersøgte stof må anses for hudirriterende.

LITTERATUR

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNA PerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Available at: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

*Nøjagtighed:* Overensstemmelsen mellem testmetodens resultater og accepterede referenceværdier. Den er et mål for testmetodens ydeevne og et af aspekterne af relevans. Udtrykket benyttes ofte som synonym for »konkordans«, forstået som den andel korrekte udfald, testmetoden fører til (33).

*Referencestof:* Et sensibiliserende eller ikkesensibiliserende stof, der anvendes som standard til sammenligning med et teststof. Et referencestof skal have følgende egenskaber: i) en eller flere ensartede og pålidelige kilder; ii) strukturel og funktionel lighed med den stofgruppe, der testes; iii) kendte fysisk/kemiske egenskaber; iv) støttedata om kendte virkninger og v) kendt styrke i det ønskede responsområde.

*Falsk negativ:* Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som negativt eller ikkeaktivt, selv om det rent faktisk er positivt eller aktivt (33).

*Falsk positiv:* Et teststof, som ved en testmetode fejlagtigt identificeres som positivt eller aktivt, selv om det rent faktisk er negativt eller ikkeaktivt (33).

*Fare:* Potentielle skadelige virkninger for menneskers sundhed og miljøet. De skadelige virkninger fremkaldes kun, hvis eksponeringen er tilstrækkelig.

*Reproducerbarhed mellem laboratorier:* Mål for, i hvilken grad forskellige kvalificerede laboratorier kan opnå de samme resultater kvalitativt og kvantitativt, når de anvender samme protokol og tester de samme teststoffer. Reproducerbarheden mellem laboratorier bestemmes forud for og under valideringsprocessen og angiver, i hvilken grad en test kan overføres mellem laboratorier med et vellykket resultat. Kaldes også ekstern reproducerbarhed (33).

*Reproducerbarhed inden for laboratorier:* Bestemmelse af, i hvilken grad kvalificeret personale på det samme laboratorium kan reproducere resultater ved anvendelse af en specifik protokol på forskellige tidspunkter. Kaldes også intern reproducerbarhed (33).

*Outlier:* En outlier er en observation, der er markant anderledes end andre værdier i en tilfældig stikprøve af en population.

*Kvalitetssikring:* En forvaltningsproces, hvor overholdelsen af laboratoriets teststandarder, krav og registreringsprocedurer og nøjagtigheden af dataoverførsler vurderes af personer, der er uafhængige af de personer, der udfører forsøget.

*Pålidelighed:* Mål for, i hvilken grad en testmetode kan udføres reproducerbart i og mellem laboratorier over en længere periode, når den udføres efter samme protokol. Den bedømmes ved beregning af reproducerbarhed inden for og mellem laboratorier (33).

*Hudsensibilisering:* En immunologisk proces, der udløses, når en disponeret person eksponeres for en inducerende kemisk allergen, som fremkalder en kutan immunrespons, der kan føre til udviklingen af kontaktsensibilisering.

*Stimulationsindeks (SI):* En værdi, der beregnes for at vurdere et teststofs potentiale for hudsensibilisering, og som er forholdet mellem proliferation i behandlingsgrupperne og proliferationen i den sideløbende vehikelkontrolgruppe.

*Teststof (eller testkemikalie):* Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne TM.

▼M4

B.52. **AKUT TOKSICITET (INHALATION) — AKUT TOKSICITETSKLASSEMETODEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 436 (2009). Den første TG 403 for akut toksicitet ved inhalation blev vedtaget i 1981 og er siden blevet revideret (se kapitel B.2 i dette bilag (1)). Efter vedtagelsen af akut toksicitetsklassemetoden (oral) (kapitel B.1.B i dette bilag) (5) vurderede man, at en akut toksicitetsklassemetode (inhalation) (ATC) skulle udvikles (2) (3) (4). En retrospektiv resultatvurdering af ATC-testmetoden for akut toksicitet ved inhalation viste, at metoden med fordel kan anvendes i forbindelse med klassificering og mærkning (6). ATC-testmetoden for inhalation er en trinvis metode, hvor der anvendes faste målkoncentrationer til at rangordne toksiciteten af testkemikaliet. Letalitet er en central effektparameter, men dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser eller er døende, aflives humant for at mindske deres lidelser. Vejledning om parametre for human behandling af dyr findes i OECD Guidance Document No. 19 (7).

2. Vejledning i udførelse og fortolkning af forsøgene i forbindelse med denne testmetode findes i Guidance Document No. 39 (GD 39) (8).

3. De definitioner, der anvendes i forbindelse med denne testmetode, er anført i tillæg 1 og GD 39 (8).

4. Testmetoden giver oplysninger om de farlige egenskaber og gør det muligt at rangordne og klassificere testkemikaliet i henhold til forordning (EF) nr. 1272/2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger (9). Hvis der kræves punktestimater af $LC_{50}$-værdier eller analyser af koncentration-respons, anvendes kapitel B.2 i dette bilag (1) som testmetode. Yderligere vejledning i valg af testmetode findes i GD 39 (8). Denne testmetode er ikke specifikt beregnet til test af særlige materialer, som f.eks. tungtopløselige isometriske eller fiberholdige materialer eller fremstillede nanomaterialer.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

5. Inden test i overensstemmelse med denne metode overvejes, bør alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet, herunder eksisterende forsøg, hvis data understøtter, at der ikke udføres yderligere test, overvejes af testlaboratoriet med henblik på at minimere omfanget af dyreforsøg. Oplysninger, der kan hjælpe med at vælge de mest hensigtsmæssige arter, stammer, køn, eksponeringsformer og testkoncentrationer, omfatter testkemikaliets identitet, kemiske struktur og fysisk-kemiske egenskaber, resultater af in vitro- eller in vivo-toksicitetstest, forventede anvendelser og potentialet for human eksponering, tilgængelige (Q)SAR-data og toksikologiske data vedrørende strukturelt relaterede stoffer. Koncentrationer, der forventes at forvolde stærk smerte og lidelse, på grund af ætsende ([1]) eller stærkt irriterende virkning, bør ikke testes ved hjælp af denne testmetode [se GD 39 (8)].

([1]) Evalueringen af ætsende virkning kan af eksperter ved hjælp af dokumentation, som f.eks. erfaringer fra mennesker og dyr, eksisterende (in vitro-) data, f.eks. kapitel B.40 (10) og B.40.A (11) i dette bilag eller OECD TG 435 (12), pH-værdier, information fra lignende stoffer eller andre relevante data.

▼M4

TESTENS PRINCIP

6. Metoden bygger på en trinvis fremgangsmåde, hvor der opnås tilstrækkelig information om teststoffets akutte toksicitet ved inhalation i en eksponeringsperiode på fire timer til, at det kan klassificeres. Andre eksponeringsvarigheder kan anvendes for at opfylde konkrete myndighedsbestemmelser. For hver af de fastlagte koncentrationstrin anvendes der tre dyr af hvert køn. Afhængigt af dyrenes dødelighed og/eller døende tilstand kan to trin være nok til at vurdere testkemikaliets akutte toksicitet. Hvis det dokumenteres, at det ene køn er mere modtageligt end det andet, kan testen fortsættes med kun det mest modtagelige køn. Resultatet af det forudgående trin afgør det efterfølgende trin, f.eks.:

a) ingen yderligere testning nødvendig

b) testning af tre dyr pr. køn eller

c) testning af seks dyr af det mest modtagelige køn, dvs. at kun de laveste estimater for toksisk klasse baseres på seks dyr pr. testkoncentrationsgruppe, uanset køn.

7. Dyr, som er døende, har tydelige smerter eller viser tegn på svære og vedvarende lidelser, bør aflives humant og betragtes ved fortolkningen af testresultaterne på samme måde som dyr, der er døde under testen. Kriterierne for aflivning af døende eller stærkt lidende dyr samt vejledning i at fastslå forudsigelig eller forestående død er genstand for en særskilt vejledning (OECD Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints) (7).

BESKRIVELSE AF METODEN

**Valg af dyreart**

8. Der anvendes raske unge dyr af sædvanligt benyttede laboratoriestammer. Den foretrukne art er rotter, og der bør gives begrundelse, hvis en anden art anvendes.

**Forberedelse af dyrene**

9. Hundyrene må ikke have født og må ikke være drægtige. På eksponeringsdagen bør dyrene være unge voksne, der er mellem 8 og 12 uger gamle, og deres kropsvægt bør være inden for ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn af tidligere eksponerede dyr i samme alder. Dyrene udtages på tilfældig måde og mærkes, så de enkelte dyr kan identificeres. Dyrene holdes i deres bure i mindst fem dage, inden testen påbegyndes, så de tilvænnes laboratorieforholdene. Dyrene tilvænnes også testudstyret i en kort perioden inden testen, da det vil mindske stress forårsaget af introduktionen til et nyt miljø.

**Dyreopdræt og -sundhed**

10. Temperaturen i forsøgsdyrrummet bør være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, selv om det muligvis ikke er muligt, hvis vand bruges som vehikel. Før og efter eksponering bør dyr generelt holdes i bur i grupper efter køn og koncentration, men antallet af dyr pr. bur må ikke bevirke, at det er vanskeligt at observere de enkelte dyr, og bør minimere tab som følge af kannibalisme og slagsmål. Hvis dyr alene eksponeres gennem næsen, skal de muligvis tilvænnes fastspændingsslanger. Disse slanger må ikke påføre dyrene unødig fysisk, termisk eller bevægelsesmæssig belastning. Fastspænding kan påvirke fysiologiske effektparametre, som f.eks. kropstemperatur (hypertermi) og/eller respiratorisk minutvolumen. Hvis der foreligger generiske data, som viser, at sådanne ændringer

▼M4

ikke forekommer i nævneværdigt omfang, er tilvænning til fastspændingsslangerne ikke nødvendig. Dyr, der med hele kroppen eksponeres for en aerosol, bør holdes i individuelle bure under eksponeringen for at undgå, at testaerosolen filtreres gennem pelsen på de andre dyr i buret. Der kan anvendes normalt og godkendt laboratoriefoder, dog ikke under eksponering, med ubegrænset forsyning af drikkevand. Belysningen skal være kunstig og bestå af 12 timers lys og 12 timers mørke.

**Inhalationskamre**

11. Karakteren af testkemikaliet og formålet med testen bør overvejes ved valget af inhalationskammer. Den foretrukne eksponeringsform er gennem næsen (dette udtryk omfatter kun hoved, kun næse og kun snude). Eksponering gennem næsen foretrækkes generelt i forbindelse med test af flydende eller faste aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. Særlige formål med testen kan bedre opfyldes ved eksponering af hele kroppen, men dette skal begrundes i testrapporten. For at sikre en stabil atmosfære, når der anvendes et kammer til hele kroppen, må forsøgsdyrenes totale volumen ikke overstige 5 % af kammerets volumen. Principperne for teknikkerne til eksponering gennem næsen eller eksponering af hele kroppen samt deres særlige fordele og ulemper er beskrevet i GD 39 (8).

EKSPONERINGSBETINGELSER

**Administration af koncentrationer**

12. Der anbefales en fast eksponeringsvarighed på fire timer, ekskl. ækvilibreringstid. Der kan være behov for andre varigheder for at opfylde specifikke krav. Dette begrundes dog i forsøgsrapporten [se GD 39 (8)]. Dyr, der eksponeres i kamre til hele kroppen, bør holdes i individuelle bure for at undgå, at de indtager testkemikaliet som følge af soignering af de andre dyr. Dyrene bør ikke fodres i eksponeringsperioden. Dyret skal have adgang til vand under helkropseksponering.

13. Dyr eksponeres for testkemikaliet i form af en gas, dampe, aerosoler eller en blanding heraf. Den fysiske tilstand, der skal testes, afhænger af testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber, den valgte koncentration og/eller den fysiske form, der højst sandsynligt vil være til stede under håndteringen og anvendelsen af testkemikaliet. Hygroskopiske og kemisk reaktive testkemikalier bør testes under tørre luftforhold. Der må ikke skabes eksplosive koncentrationer.

**Partikelstørrelsesfordeling**

14. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for alle aerosoler og dampe, der kan kondensere og danne aerosoler. For at sikre, at alle relevante områder af luftvejene eksponeres, anbefales aerosoler med en massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) i området fra 1 til 4 μm med en geometrisk standardafvigelse ($\sigma_g$) i området fra 1,5 til 3,0 (8) (13) (14). Der bør ydes en rimelig indsats for at overholde denne standard, men en ekspertvurdering gives, hvis det ikke er muligt. Partikler fra tungmetalrøg kan f.eks. være mindre end denne standard, og ladede partikler, fibre og hygroskopiske materialer (som udvides i luftvejenes fugtige miljø) kan overstige standarden.

▼M4

**Fremstilling af testkemikalie i vehikel**

15. Der kan anvendes et vehikel til at frembringe et testkemikalie med den rigtige koncentration og partikelstørrelse i atmosfæren. Generelt foretrækkes vand. Partikelformigt materiale kan underkastes mekaniske processer for at opnå den krævede partikelstørrelsesfordeling. Det skal dog omhyggeligt sikres, at testkemikaliet ikke dekomponerer eller ændres. Hvis mekaniske processer menes at have ændret teststoffets sammensætning (f.eks. ekstreme temperaturer som følge af friktion under formaling), bør testkemikaliets sammensætning kontrolleres analytisk. Kontaminering af testkemikaliet skal undgås. Det er ikke nødvendigt at teste granulat, der ikke er letsmuldrende, og som netop er formuleret, så det ikke kan inhaleres. Der bør anvendes en slidtest til at dokumentere, at der ikke frembringes respirable partikler under håndteringen af granulat. Hvis en slidtest frembringer respirable partikler, bør der udføres en inhalationstoksicitetstest.

**Kontroldyr**

16. En sideløbende negativ (luft)kontrolgruppe er ikke nødvendig. Hvis et andet vehikel end vand bruges til at frembringe testatmosfæren, skal en vehikelkontrolgruppe kun anvendes, hvis historiske inhalationstoksicitetsdata ikke foreligger. Hvis et toksicitetsforsøg vedrørende et testkemikalie, der er formuleret i et vehikel, ikke påviser toksicitet, følger det, at vehiklet er ikke-toksisk ved den testede koncentration. Der er derfor ikke brug for en vehikelkontrol.

OVERVÅGNING AF EKSPONERINGSBETINGELSER

**Luftgennemstrømning i kammer**

17. Luftgennemstrømningen gennem kammeret skal nøje kontrolleres, overvåges løbende og registreres mindst én gang i timen under eksponering. Overvågningen af koncentrationen (eller stabiliteten) i testatmosfæren indgår i målingen af alle dynamiske parametre og giver indirekte mulighed for at kontrollere alle relevante dynamiske parametre for generering af atmosfæren. Genindånding i kamre til eksponering gennem næsen skal undgås, hvis luftgennemstrømningen gennem eksponeringssystemet ikke er tilstrækkelig til at tilvejebringe en dynamisk gennemstrømning i den kemiske testatmosfære. Der er fastlagte metodologier, der kan bruges til at påvise, at genindånding ikke finder sted under de valgte driftsbetingelser (8) (15). Iltkoncentrationen skal være mindst 19 %, og kuldioxidkoncentrationen må ikke overstige 1 %. Hvis der er grund til at antage, at disse standarder ikke kan overholdes, skal ilt- og kuldioxidkoncentrationerne måles.

**Kammerets temperatur og relative fugtighed**

18. Kammerets temperatur skal være 22 ± 3 °C. Den relative fugtighed i dyrenes vejrtrækningszone skal ved eksponering gennem næsen og helkropseksponering overvåges og registreres mindst tre gange ved varigheder af op til fire timer og hver time ved kortere varigheder. Den relative fugtighed bør være 30-70 %, men dette er ikke altid muligt (f.eks. ved test af vandbaserede blandinger) eller kan ikke måles på grund af testkemikaliets indvirkning på testmetoden.

▼M4

**Testkemikalie: nominel koncentration**

19. Når det er muligt, bør den nominelle eksponeringskoncentration i kammeret beregnes og registreres. Den nominelle koncentration er massen af det genererede testkemikalie divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammersystemet. Den nominelle koncentration bruges ikke til at karakterisere dyrenes eksponering, men en sammenligning af den nominelle koncentration og den faktiske koncentration giver en indikation af testsystemets genereringseffektivitet og kan derfor bruges til at opdage eventuelle genereringsproblemer.

**Testkemikalie: faktisk koncentration**

20. Den faktiske koncentration er koncentrationen af testkemikaliet ved dyrenes vejrtrækningszone i et inhalationskammer. Faktiske koncentrationer kan bestemmes med specifikke metoder (f.eks. direkte prøveudtagning, adsorptive eller kemisk reaktive metoder og efterfølgende analytisk karakterisering) eller med ikke-specifikke metoder, som f.eks. gravimetrisk filteranalyse. Brugen af gravimetrisk analyse er kun acceptabel for pulverbaserede enkeltkomponent-aerosoler eller aerosoler af væsker med lav flygtighed og bør støttes af hensigtsmæssige testkemikaliespecifikke karakteriseringer udført før testen. Koncentrationen af pulverbaserede flerkomponent-aerosoler kan også bestemmes ved hjælp af gravimetrisk analyse. Det kræver dog analysedata, der viser, at det luftbårne materiales sammensætning svarer til udgangsmaterialet. Hvis denne information ikke er tilgængelig, kan det være nødvendigt at gentage analysen af testkemikaliet (ideelt i dets luftbårne tilstand) med regelmæssige intervaller i løbet af forsøget. For aerosoliserede stoffer, der kan fordampe eller sublimere, bør det påvises, at alle faser er indsamlet ved hjælp af den valgte metode. Målkoncentrationer, nominelle koncentrationer og faktiske koncentrationer angives i forsøgsrapporten, men kun de faktiske koncentrationer bruges i de statistiske analyser til at beregne letale koncentrationer.

21. Der anvendes så vidt muligt én batch af testkemikaliet, og prøven opbevares under forhold, der bevarer dens renhed, homogenitet og stabilitet. Inden forsøget påbegyndes, bør testkemikaliet karakteriseres, herunder dets renhed og, hvis det er teknisk muligt, identitet og mængde af identificerede kontaminanter og urenheder. Dette kan påvises ved hjælp af bl.a. følgende data: retentionstid og relativt topareal, molekylvægt fra massespektroskopi- eller gaskromatografianalyser eller andre vurderinger. Selv om testlaboratoriet ikke er ansvarligt for prøvens identitet, bør testlaboratoriet af hensyn til sikkerheden bekræfte rekvirentens karakterisering i hvert fald på en begrænset måde (f.eks. farve, fysisk form osv.).

22. Eksponeringsatmosfæren holdes så konstant som muligt og overvåges kontinuerligt og/eller i intervaller afhængigt af analysemetoden. Hvis intervalbaseret prøveudtagning anvendes, bør der udtages atmosfæreprøver i kammeret mindst to gange i løbet af et forsøg med en varighed på fire timer. Hvis det ikke er muligt på grund af begrænsede luftgennemstrømningshastigheder eller lave koncentrationer, kan en prøve udtages over hele eksponeringsperioden. Hvis der forekommer markante udsving fra prøve til prøve, bør der anvendes fire prøver pr. eksponering for de næste testede koncentrationer. De enkelte prøver for koncentrationen i kammeret bør ikke afvige fra middelkoncentrationen i kammeret med mere end ± 10 % for gasser og dampe eller ± 20 % for flydende eller faste aerosoler. Tiden til ækvilibrering af kammer ($t_{95}$) beregnes og registreres. Varigheden af en eksponering strækker sig over den tid, hvor testkemikaliet genereres, og det omfatter den tid, der kræves for at opnå $t_{95}$. Vejledning i beregning af $t_{95}$ findes i GD 39 (8).

▼M4

23. For meget komplekse blandinger, der består af gasser/dampe og aerosoler (f.eks. forbrændingsatmosfærer og testkemikalier genereret af formålsbestemte slutprodukter/apparater), kan hver fase opføre sig forskelligt i et inhalationskammer, og der udvælges derfor mindst ét indikatorstof (analysand), normalt det primære aktivstof i blandingen, fra hver fase (gas/damp og aerosol). Hvis testkemikaliet er en blanding, rapporteres analysekoncentrationen for den samlede blanding og ikke kun for det aktive stof eller komponenten (analysand). Yderligere oplysninger om faktiske koncentrationer findes i GD 39 (8).

**Testkemikalie: partikelstørrelsesfordeling**

24. Aerosolers partikelstørrelsesfordeling bestemmes mindst to gange i løbet af hver eksponering på fire timer ved hjælp af en kaskadeimpaktor eller et andet instrument, f.eks. et instrument til aerodynamisk partikelstørrelsesbestemmelse. Hvis der kan påvises ækvivalens mellem de resultater, der er opnået ved hjælp af kaskadeimpaktoren eller et alternativt instrument, kan det alternative instrument bruges i hele forsøget. Et andet apparat, f.eks. et gravimetrisk filter eller en impinger/gas bubbler, anvendes parallelt med det primære instrument til at bekræfte det primære instruments opsamlingseffektivitet. Den massekoncentration, der fås ved hjælp af partikelstørrelsesanalysen, skal være inden for rimelige grænser af den massekoncentration, der fås ved hjælp af filteranalyse [se GD 39 (8)]. Hvis ækvivalens kan påvises i forsøgets tidligere fase, kan yderligere bekræftelsesmålinger udelades. Af hensyn til dyrevelfærden træffes der foranstaltninger for at minimere inkonklusive data, der kan gøre det nødvendigt at gentage en eksponering. Bestemmelse af partikelstørrelse udføres for dampe, hvis der er mulighed for, at kondensering af dampe kan føre til dannelsen af en aerosol, eller hvis der konstateres partikler i en dampatmosfære med potentiale for blandede faser (se afsnit 14).

FREMGANGSMÅDE

**Hovedforsøg**

25. Der anvendes tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn på hvert trin. Hvis andre gnaverarter end rotter eksponeres gennem næsen, kan de maksimale eksponeringsvarigheder justeres for at minimere artsspecifikke lidelser. Det koncentrationsniveau, der anvendes som startdosis, vælges blandt de fire fastsatte niveauer, og det indledende koncentrationsniveau skal være det, der med størst sandsynlighed forventes at fremkalde toksicitet i nogle af de doserede dyr. Forsøgsplanerne for gasser, dampe og aerosoler (anført i tillæg 2-4) repræsenterer test med afskæringsværdierne for CLP-kategori 1-4 (9) for gasser (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4h) (tillæg 2), for dampe (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4h) (tillæg 3) og for aerosoler (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4h) (tillæg 4). Kategori 5, som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), vedrører koncentrationer over de pågældende grænsekoncentrationer. For hver startkoncentration gælder den pågældende forsøgsplan. I forsøgsplanen følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr, indtil en kategorisering kan foretages.

26. Tidsintervallet mellem eksponeringsgrupperne bestemmes ud fra de toksiske symptomers indsætten, varighed og sværhed. Eksponering af dyrene ved det næste koncentrationsniveau udsættes, indtil der er rimelig sikkerhed for, at de tidligere testede dyr vil overleve. Der bør gå 3-4 dage mellem eksponeringerne på hvert koncentrationsniveau for at få den nødvendige tid til at iagttage en eventuel forsinket toksisk virkning. Tidsintervallet kan korrigeres efter behov, f.eks. hvis den opnåede respons er inkonklusiv.

▼M4

**Grænsetest**

27. En grænsetest bruges, når testkemikaliet vides eller forventes at være stort set ikke-toksisk, dvs. det fremkalder toksisk respons, der kun ligger over den fastsatte grænsekoncentration. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet kan fås ud fra viden om tilsvarende testede stoffer eller blandinger, idet der tages hensyn til art og procentuelt indhold af de stoffer, der vides at være af toksikologisk betydning. Når der kun foreligger få eller slet ingen oplysninger om testkemikaliets toksicitet, eller når testkemikaliet forventes at være toksisk, bør hovedforsøget udføres [se GD 39 (8) for yderligere vejledning].

28. Ved hjælp af den sædvanlige fremgangsmåde eksponeres tre dyr pr. køn eller seks dyr af det mest modtagelige køn for koncentrationer på henholdsvis 20 000 ppm for gasser, 20 mg/l for dampe og 5 mg/l for støv/tåge (hvis det er muligt). Dette udgør grænsetesten for denne testmetode. Ved test af aerosoler bør det primære mål være at opnå en respirabel partikelstørrelse (dvs. MMAD på 1-4 μm). For de fleste testkemikalier er det muligt ved en koncentration på 2 mg/l. Test af aerosoler ved en koncentration på mere end 2 mg/l bør kun forsøges, hvis der kan opnås en respirabel partikelstørrelse [se GD 39 (8)]. I henhold til GHS (16) bør test, der overstiger en grænsekoncentration, undgås af hensyn til dyrevelfærden. Test i GHS-kategori 5 (16), som ikke er gennemført i forordning (EF) nr. 1272/2008 (9), bør kun overvejes, når resultaterne af en sådan test med overvejende sandsynlighed ventes at få direkte relevans for beskyttelsen af menneskers sundhed, og der skal gives en begrundelse i forsøgsrapporten. I tilfælde af potentielt eksplosive testkemikalier skal der udvises forsigtighed for at undgå forhold, der kan fremkalde eksplosion. For at undgå unødvendig brug af dyr bør et testforsøg gennemføres uden dyr inden grænsetesten, så det sikres, at betingelserne i kammeret for en grænsetest kan opnås.

OBSERVATIONER

29. Dyrene bør hyppigt observeres klinisk i eksponeringsperioden. Efter eksponering bør kliniske observationer foretages mindst to gange på eksponeringsdagen eller hyppigere, hvis det begrundes af dyrenes respons på behandlingen, og derefter mindst én gang dagligt i sammenlagt 14 dage. Varigheden af observationsperioden er ikke fast, men bestemmes ud fra arten og tidspunktet for indtræden af kliniske tegn og varigheden af restitutionsperioden. Tidspunkterne for toksiske symptomers indsætten og forsvinden er vigtige, navnlig hvis der er tendens til forsinkede toksiske symptomer. Alle observationer registreres systematisk, og der føres individuel protokol for hvert dyr. Dyr, som findes at være døende, og dyr, som udviser svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, skal aflives humant af hensyn til dyrevelfærden. Stor omhu bør udvises ved undersøgelser for kliniske tegn på toksicitet for at sikre, at indledningsvist dårligt udseende og forbigående respirationsændringer, der er resultatet af selve eksponeringen, ikke forveksles med toksicitet relateret til testkemikaliet. De principper og kriterier, der er sammenfattet i Humane Endpoints Guidance Document, skal ligeledes tages i betragtning (7). Når dyr aflives af humane grunde eller findes døde, skal dødstidspunktet registreres så nøjagtigt som muligt.

▼M4

30. Observationer i burene skal omfatte forandringer i hud, pels, øjne og slimhinder, respirationssystem, kredsløb, autonomt nervesystem og centralnervesystem samt somatomotorisk aktivitet og adfærdsmønster. Hvis det er muligt, registreres evt. sondring mellem lokale og systemiske virkninger. Man skal være opmærksom på, om der kan iagttages tremor, kramper, spytflåd, diarré, sløvhed, søvn og koma. Målingen af rektal temperatur kan dokumentere refleks-bradypnø eller hypo-/hypertermia relateret til behandling eller fangenskab.

**Kropsvægt**

31. Det enkelte dyrs vægt registreres én gang i tilvænningsperioden, på eksponeringsdagen inden eksponeringen (dag 0) og mindst på dag 1, 3 og 7 (og derefter ugentligt), og den registreres på tidspunktet for død eller aflivning, hvis det indtræder efter dag 1. Kropsvægt anerkendes som en kritisk indikator for toksicitet, og dyr med et vedvarende vægttab på ≥ 20 % sammenlignet med vægten for forsøget, overvåges nøje. Overlevende dyr vejes og aflives humant ved afslutningen af perioden efter eksponering.

**Patologi**

32. Alle forsøgsdyr (herunder dem, der dør under forsøget eller aflives og tages ud af forsøget af dyrevelfærdsmæssige grunde) underkastes makroskopisk obduktion. Hvis makroskopisk obduktion ikke kan udføres umiddelbart efter opdagelsen af et dødt dyr, nedkøles (ikke fryses) dyret ved en temperatur, der er tilstrækkeligt lav til at minimere autolyse. Makroskopisk obduktion udføres så hurtigt som muligt, helst inden for en eller to dage. Alle makroskopiske patologiske forandringer registreres for hvert dyr med særligt fokus på forandringer i luftvejene.

33. Yderligere undersøgelser, der på forhånd er medtaget som standard, kan overvejes for at udvide den fortolkningsmæssige værdi af undersøgelsen, f.eks. vejning af overlevende rotters lunger og tilvejebringelse af dokumentation for irritation ved hjælp af mikroskopisk undersøgelse af luftvejene. Undersøgte organer kan omfatte organer, som udviser makroskopiske patologiske forandringer hos dyr, som overlever i 24 timer eller længere, og organer, som vides eller forventes at være påvirket. Mikroskopisk undersøgelse af hele luftvejene kan give nyttige informationer i forbindelse med testkemikalier, der reagerer med vand, f.eks. syrer og hygroskopiske testkemikalier.

DATA OG RAPPORTERING

**Data**

34. Der skal fremlægges data for de enkelte dyr om kropsvægt og obduktionsfund. For hver testgruppe opstilles i tabelform kliniske observationsdata om antal dyr ved forsøgets begyndelse, antal dyr, som viser tegn på toksisk virkning, antal dyr, som er fundet døde under forsøget eller aflivet af humanitære grunde, dødstidspunkt for de enkelte dyr, beskrivelse af toksiske virkninger og disses tidsmæssige forløb og reversibilitet samt obduktionsfund.

▼M4

**Testrapport**

35. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, når de er relevante:

*Forsøgsdyr og pasning*

— beskrivelse af burforhold, herunder: antal (eller ændring i antal) dyr pr. bur, strøelse, omgivende temperatur og relativ fugtighed, lysperiode og foder

— anvendt art/stamme og begrundelse for anvendelse af andre arter end rotte

— dyrenes antal, alder og køn

— randomiseringsmetode

— nærmere oplysninger om foderets og vandets kvalitet (herunder fødens art/oprindelse, vandets oprindelse)

— beskrivelse af konditionering før test, herunder foder, karantæne og behandling for sygdom.

*Testkemikalie*

— fysisk tilstand, renhed og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber (herunder isomeri)

— identifikationsoplysninger og CAS-nr. (Chemical Abstract Services Registry Number), hvis det kendes.

*Vehikel*

— begrundelse for brug af vehikel og begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand

— historiske eller samtidige data, der viser, at vehiklet ikke påvirker resultatet af forsøget.

*Inhalationskammer*

— beskrivelse af inhalationskammeret, herunder dimensioner og rumfang

— oprindelse og beskrivelse af udstyr anvendt til eksponering af dyr og til generering af atmosfære

— apparatur til måling af temperatur, fugtighed, partikelstørrelse og faktisk koncentration

— luftkilde, behandling af tilført/udledt luft og konditioneringssystem

— metoder, der er anvendt til kalibrering af apparatur for at sikre en homogen testatmosfære

— trykforskel (positiv eller negativ)

— eksponeringsporte pr. kammer (eksponering gennem næsen); placering af dyr i systemet (helkropseksponering)

— testatmosfærens tidsmæssige homogenitet/stabilitet

— placering af temperatur- og fugtighedssensorer og udtagning af stikprøve af testatmosfære i kammer

— luftgennemstrømningshastigheder, luftgennemstrømningshastighed/eksponeringsport (eksponering gennem næsen) eller dyrebelastning/kammer (helkropseksponering)

— information om det apparatur, der er anvendt til at måle ilt og kuldioxid, hvis det er relevant

▼M4

— tid, der kræves til at opnå ligevægt i inhalationskammeret ($t_{95}$)

— antal volumenændringer pr. time

— evt. måleudstyr.

*Eksponeringsdata:*

— begrundelse for valg af målkoncentration i hovedforsøget

— nominelle koncentrationer (samlet masse af det genererede testkemikalie i inhalationskammeret divideret med den samlede mængde luft, der passerer gennem kammeret)

— faktiske koncentrationer af testkemikaliet indsamlet fra dyrenes vejrtrækningszone; for testblandinger, der producerer heterogene fysiske former (gasser, dampe eller aerosoler), kan hver enkelt analyseres separat

— alle luftkoncentrationer rapporteres i masseenheder (f.eks. mg/l, mg/$m^3$ osv.); volumenenheder (f.eks. ppm og ppb) kan også rapporteres i parentes

— partikelstørrelsesfordeling, massemedian af den aerodynamiske diameter (MMAD) og geometrisk standardafvigelse (σg), herunder deres beregningsmetoder; individuelle partikelstørrelsesanalyse rapporteres.

*Testbetingelser*

— nærmere oplysninger om fremstilling af testkemikalie, herunder oplysninger om fremgangsmåder anvendt til at reducere partikelstørrelsen af faste materialer eller fremstille opløsninger af testkemikaliet; hvis mekaniske processer har ændret testkemikaliets sammensætning, medtages resultaterne af analyser, som bekræfter testkemikaliets sammensætning

— en beskrivelse (helst med diagram) af det apparatur, der bruges til at generere testatmosfæren og til at eksponere dyrene for testatmosfæren

— nærmere oplysninger om den anvendte analysemetode og valideringsmetode (herunder genfindingsgrad for testkemikaliet fra prøvemediet)

— begrundelse for valget af testkoncentrationer.

*Resultater*

— opstilling i tabelform af temperatur, fugtighed og luftgennemstrømning i kammer

— opstilling i tabelform af data om nominel og faktisk koncentration i kammer

— opstilling i tabelform af data om partikelstørrelse i tabelform, herunder data om indsamling af analyseprøve, partikelstørrelsesfordeling og beregning af MMAD og $\sigma_g$

— opstilling i tabelform af responsdata og koncentrationsniveau for hvert dyr (dvs. dyr, som viser tegn på toksicitet, herunder mortalitet, og virkningernes art, sværhed og varighed)

— kropsvægten for det enkelte dyr registreret på forsøgsdage; dato og klokkeslæt for dyrets død, hvis denne indtræder før planlagt aflivning; for hvert dyr, toksiske virkningers indsætten, tidsforløb, og hvorvidt de er reversible

▼M4

— for hvert dyr evt. obduktionsfund og histopatologiske fund

— klassificering i CLP-kategori og afskæringsværdi for $LC_{50}$.

*Diskussion og fortolkning af resultater*

— Der lægges særlig vægt på beskrivelsen af de metoder, der er anvendt til at opfylde denne testmetodes kriterier, f.eks. grænsekoncentrationen eller partikelstørrelsen.

— Partiklernes respirabilitet i lyset af de overordnede resultater beskrives, især hvis partikelstørrelseskriteriet ikke kunne opfyldes

— Konsistensen mellem de metoder, der er anvendt til at bestemme nominelle og faktiske koncentrationer og relationen mellem den faktiske koncentration og den nominelle koncentration beskrives i den overordnede vurdering af forsøget.

— Den sandsynlige dødsårsag og den fremherskende virkningsmåde (systemisk i forhold til lokal) beskrives.

— Der gives en forklaring, hvis det var nødvendigt at foretage human aflivning af dyr, som udviste svære smerter og/eller vedvarende tegn på svære lidelser, baseret på kriterierne i OECD Guidance Document on Humane Endpoints (7).

*LITTERATUR:*

(1) Kapitel B.2 i dette bilag, Akut toksicitet (Inhalation).

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W og Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D og Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537-549.

(4) Diener W og Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alterations to $LD/LC_{50}$ Tests. ALTEX 1: 129-134.

(5) Kapitel B.1 i dette bilag, Akut inhalationstoksicitet — Akut toksisitetsklassemetode.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 105. Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition. Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39. OECD, Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1272/2008 af 16. december 2008 om klassificering, mærkning og emballering af stoffer og blandinger og om ændring og ophævelse af direktiv 67/548/EØF og 1999/45/EF og om ændring af forordning (EF) nr. 1907/2006, EUT L 353 af 31.12.2008, s. 1.

▼**M4**

(10) Kapitel B.40 i dette bilag, In vitro-hudætsning: måling af transkutan elektrisk modstand (TER).

(11) Kapitel B.40.A i dette bilag, In vitro-hudætsning: test med human hudmodel.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Findes på: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl*. Toxicol. 18: 321-327.

(15) Pauluhn J og Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) FN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York og Genève. Findes på: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

*Tillæg 2*

**Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for gasser (ppm/4h)**

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 2a: startkoncentration er 100 ppm

Tillæg 2b: startkoncentration er 500 ppm

Tillæg 2c: startkoncentration er 2 500 ppm

Tillæg 2d: startkoncentration er 20 000 ppm

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

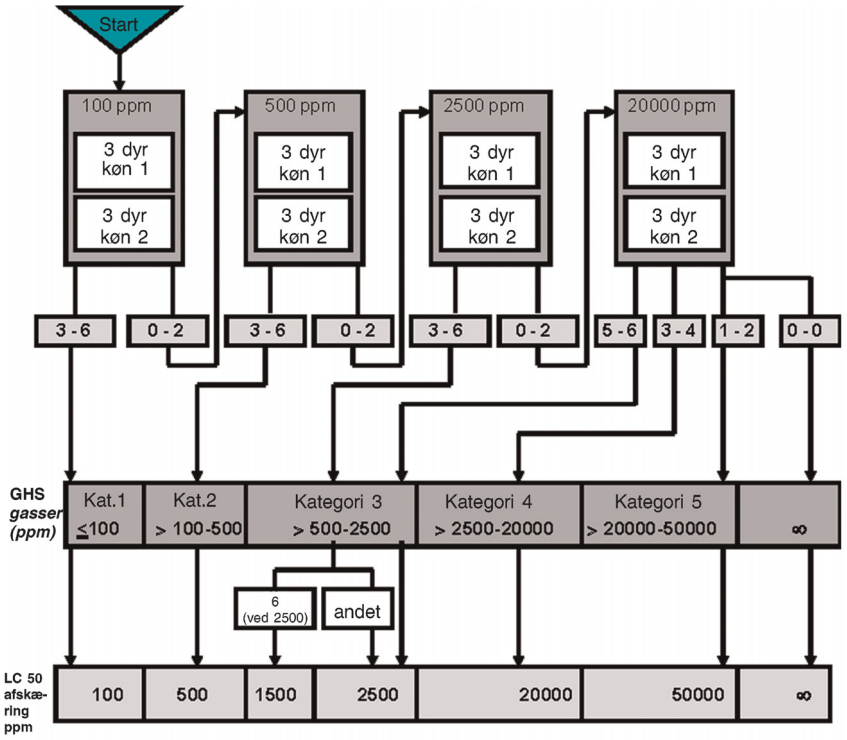
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

*Tillæg 2a*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 100 ppm/4 t for gasser**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: uklassificeret

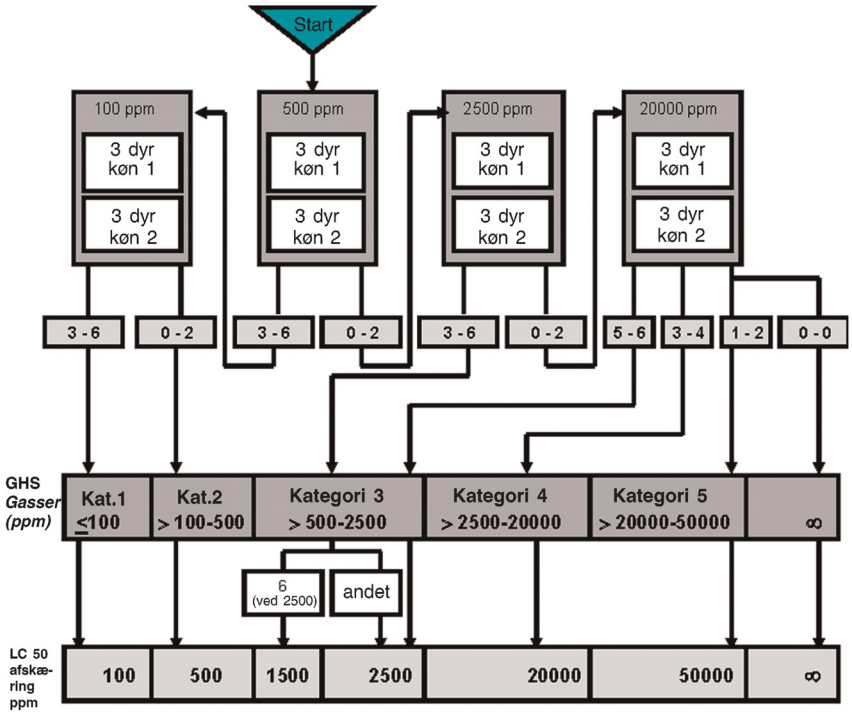
— Testved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 2b*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 500 ppm/4 t for gasser**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

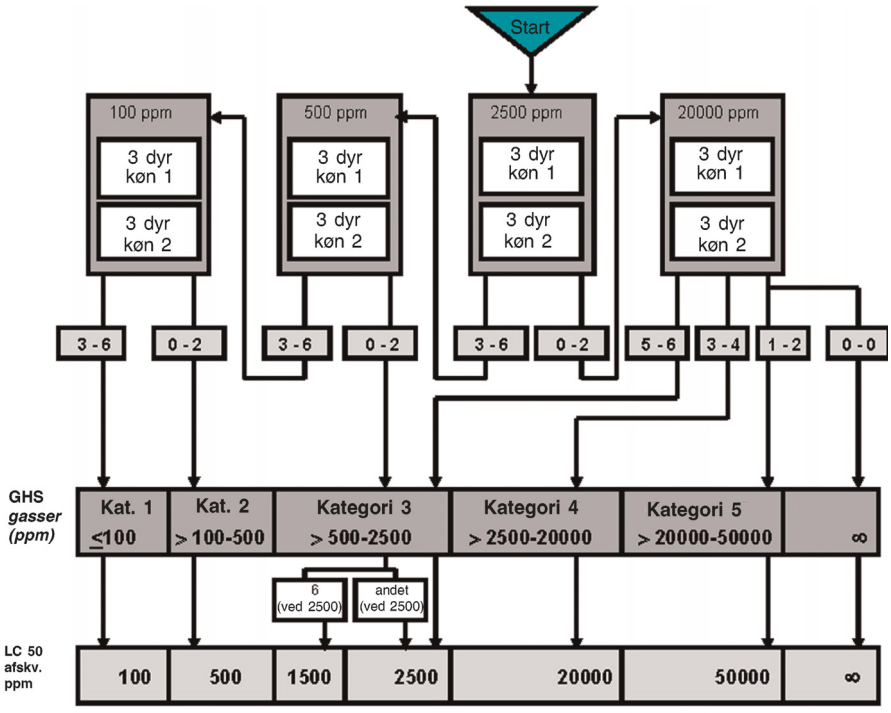
— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 2c*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 500 ppm/4 t for gasser**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

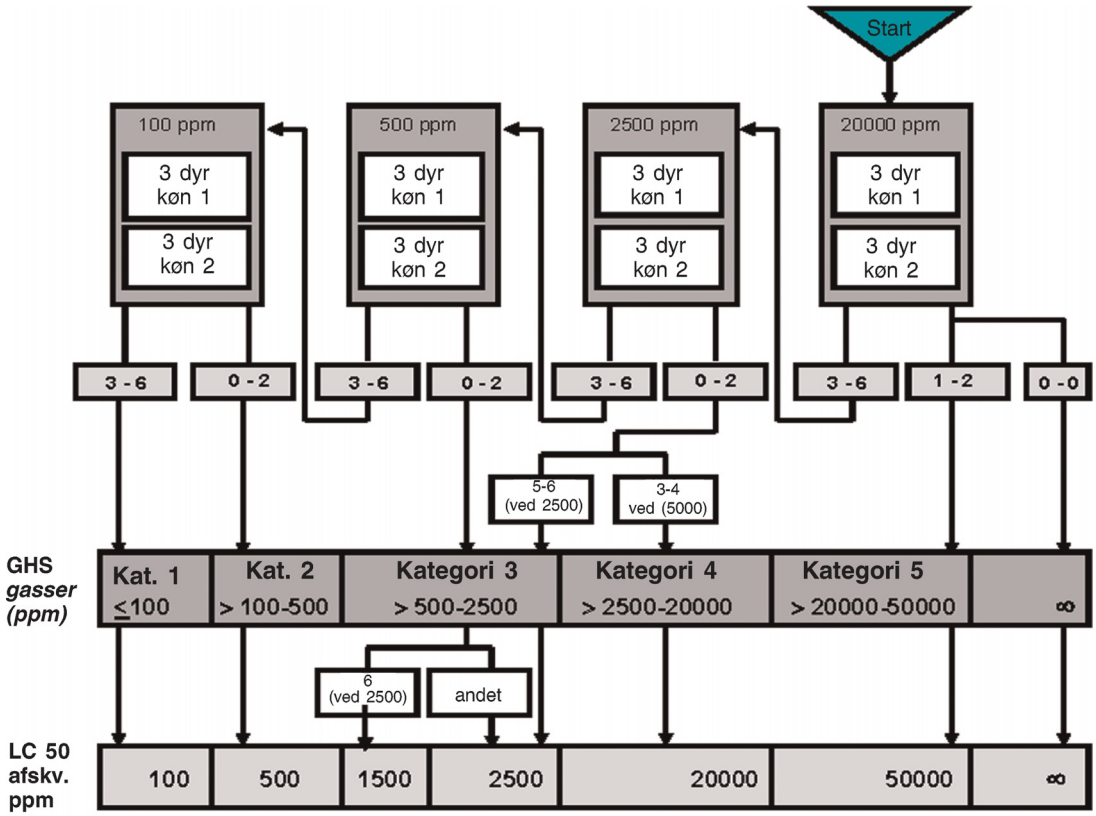
— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 2d*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 000 ppm/4 t for gasser**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn pr. trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

— Test ved ≥ 20000 ppm/4t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 3*

**Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for dampe (mg/l/4h)**

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 3a: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 3b: startkoncentration er 2,0 mg/l

Tillæg 3c: startkoncentration er 10 mg/l

Tillæg 3d: startkoncentration er 20 mg/l

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

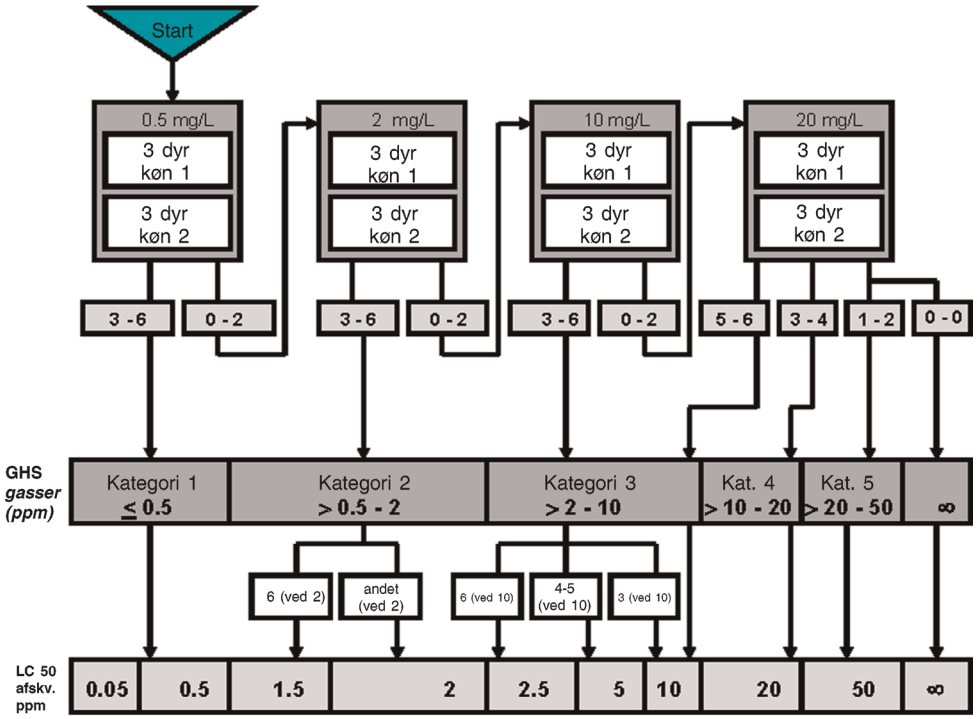
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

*Appendix 3a*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for dampe**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

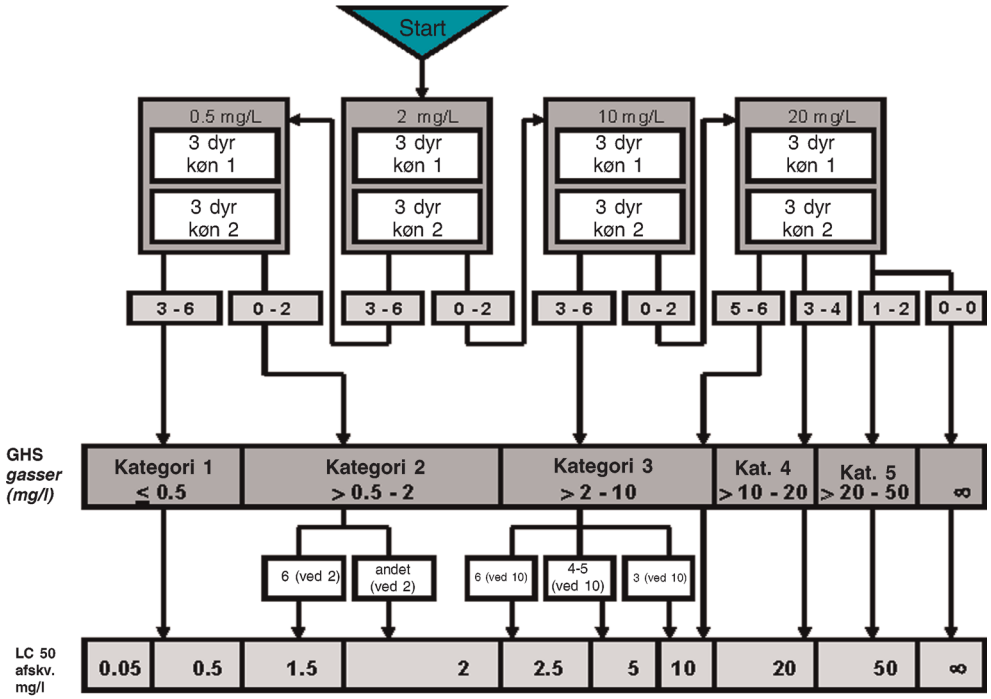
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 3b*

**Akut Toxicitet (Inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 2 mg/4 t for dampe**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

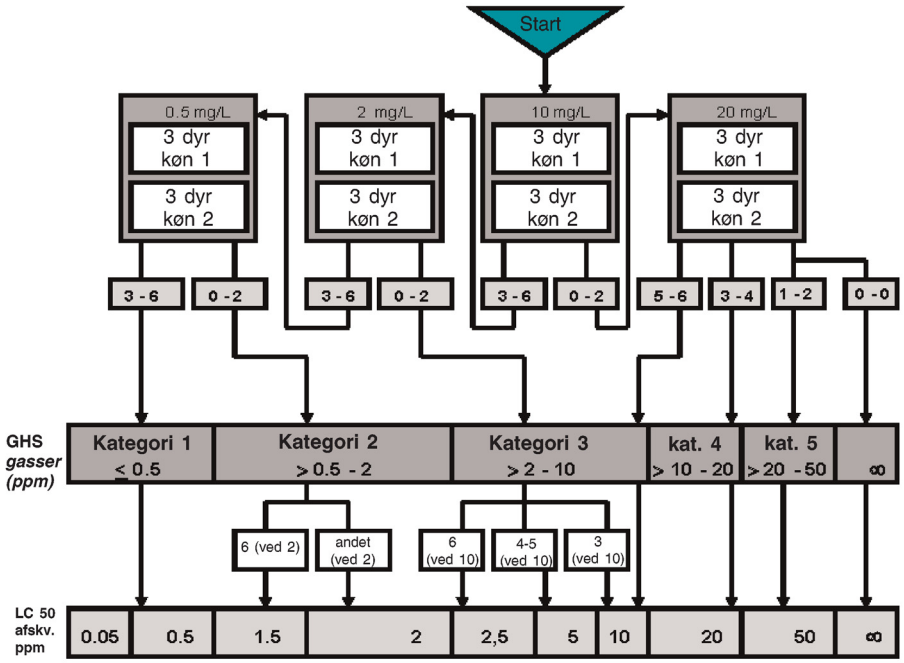
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 3c*

**Akut Toxicitet (Inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 10 mg/L/4 t for dampe**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0–6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

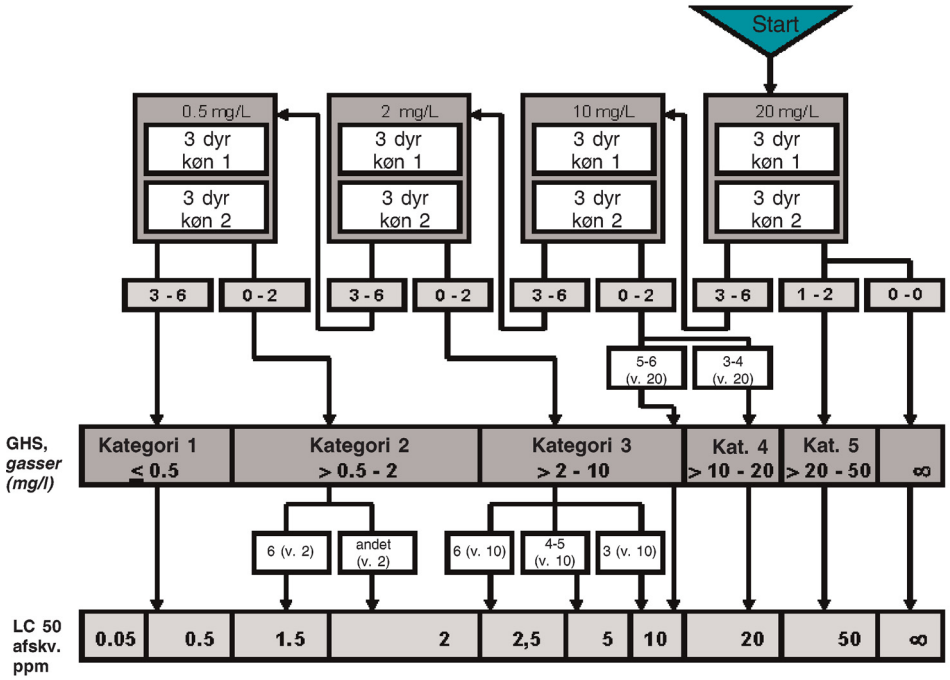
— Test ved 50 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 3d*

**Akut Toxicitet (Inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 20 mg/L/4 t for dampe**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

— Test ved 50 mg/L/4 t se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 4*

**Fremgangsmåde, som skal følges for hver startkoncentration for aerosoler (mg/l/4h)**

Generelle bemærkninger ([1])

For hver startkoncentration følges den forsøgsplan, der er anført i dette tillæg.

Tillæg 4a: startkoncentration er 0,05 mg/l

Tillæg 4b: startkoncentration er 0,5 mg/l

Tillæg 4c: startkoncentration er 1 mg/l

Tillæg 4d: startkoncentration er 5 mg/l

Ved testfremgangsmåden følges pilene, afhængigt af antallet af humant aflivede eller døde dyr.

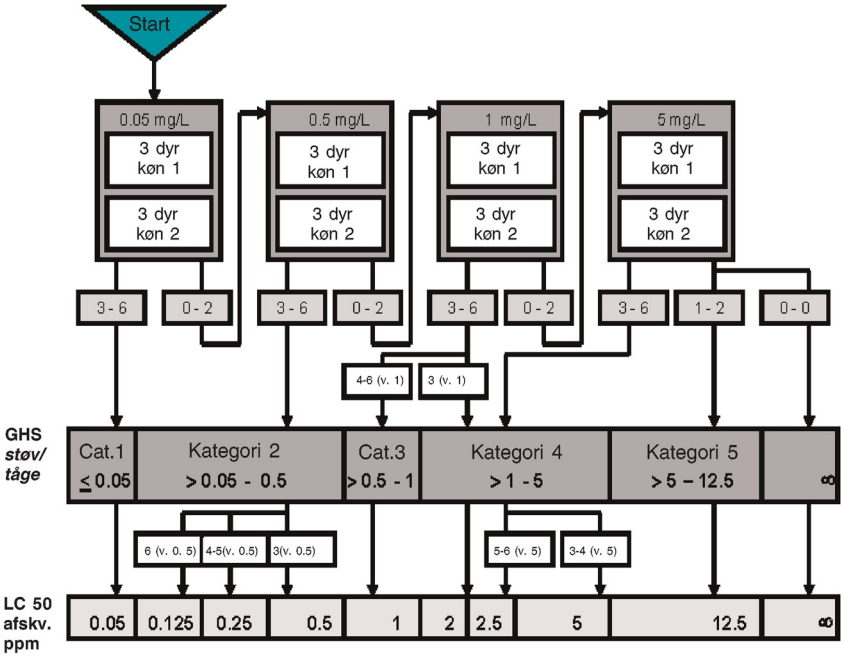
([1]) I de følgende tabeller henvises der til GHS — Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Den tilsvarende EU-klassificering er forordning (EF) nr. 1272/2008. Ved akut toksicitet (inhalation) gennemføres kategori 5 ikke ved forordning (EF) nr. 1272/2008 (9).

▼M4

*Tillæg 4a*

**Akut Toxicitet (Inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 0,05 mg/L/4 t for dampe**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin

— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: ikke klassificeret

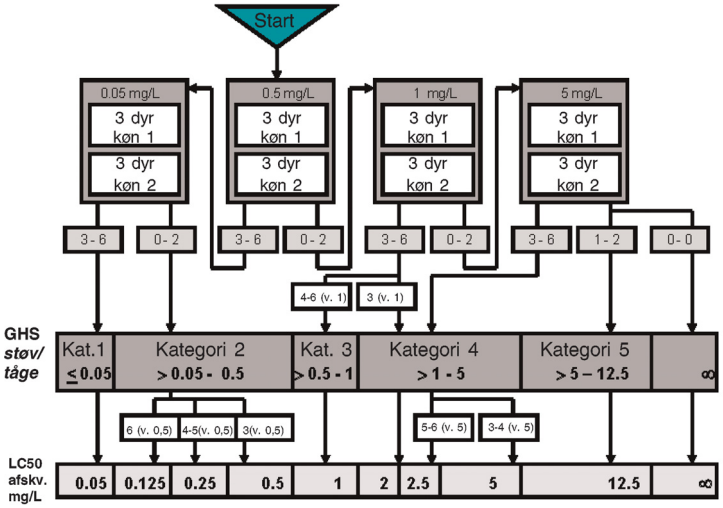
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 4b*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgansmåde med startkoncentration på 0,5 mg/L/4 t for aerosoler**



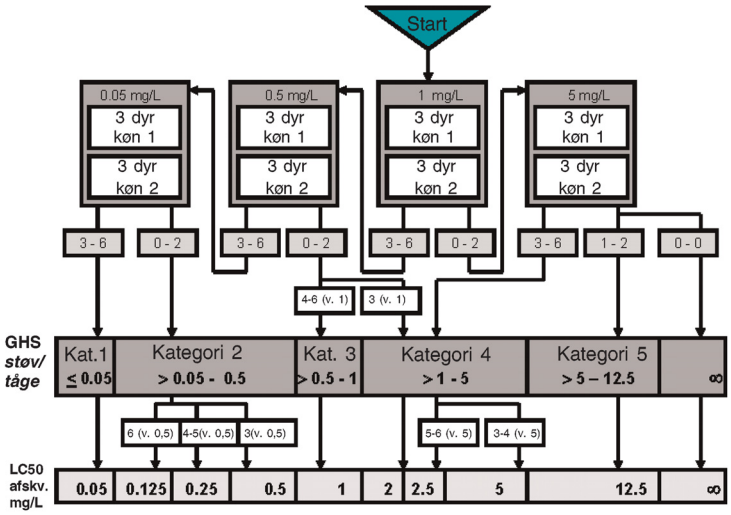

— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 4c*

**Akut toxicitet (inhalation):**

**Fremgansmåde med startkoncentration på 1 mg/L/4 t for aerosoler**



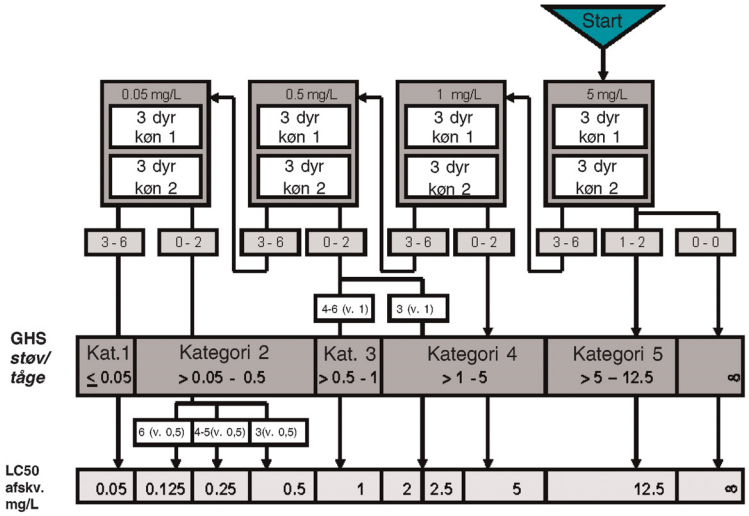

— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)

▼M4

*Tillæg 4d*

**Akut Toxicitet (Inhalation):**

**Fremgangsmåde med startkoncentration på 5 mg/L/4 t for aerosoler**




— 3 ♂ + 3 ♀, eller 6 dyr af det mest modtagelige køn til hvert trin
— 0-6: antal moribunde eller døde dyr/testet koncentration
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: ikke klassificeret
— Test ved 12,5 mg/L/4 t: se Guidance Document 39 (8)«

▼B

## DEL C: METODER TIL BESTEMMELSE AF ØKOTOKSICITET

INDHOLDSFORTEGNELSE


| | |
|---|---|
| C.1. | AKUT TOKSICITET FOR FISK |
| C.2. | DAPHNIA SP. AKUT IMMOBILISATIONSTEST |
| C.3. | FERSKVANDSALGER OG CYANOBAKTERIER, VÆKSTHÆMNINGSTEST |
| C.4. | BESTEMMELSE AF »LET« BIONEDBRYDELIGHED |
| DEL I. | GENERELLE BETRAGTNINGER |
| DEL II. | DOC-ELIMINERING (METODE C.4-A) |
| DEL III. | MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST (METODE C.4-B) |
| DEL IV. | $CO_2$-UDVIKLING (METODE C.4-C) |
| DEL V. | MANOMETRISK RESPIROMETRI (METODE C.4-D) |
| DEL VI. | CLOSED BOTTLE TEST (METODE C.4-E) |
| DEL VII. | MITI-TEST (METODE C.4-F) |
| C.5. | NEDBRYDNING — BIOKEMISK OXYGENFORBRUG |
| C.6. | NEDBRYDNING — KEMISK OXYGENFORBRUG |
| C.7. | NEDBRYDNING — ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH |
| C.8. | TOKSICITET FOR REGNORME — TEST I SYNTETISK JORD |
| C.9. | BIOLOGISK NEDBRYDNING — ZAHN-WELLENS TEST |
| C.10. | SIMULERINGSFORSØG VEDRØRENDE AEROB SPILDEVANDSRENSNING: C.10.A: AKTIVEREDE SLAMENHEDER — C.10.B: BIOFILM |
| C.11. | BIOLOGISK NEDBRYDNING — AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST |
| C.12. | BIOLOGISK NEDBRYDNING — MODIFICERET SCAS-TEST |
| C.13. | BIOKONCENTRERING: GENNEMSTRØMNINGSTEST MED FISK |
| C.14. | VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL |
| C.15. | FISK, KORTTIDSTOKSICITETSTEST PÅ *FISKEEMBRYONER* OG BLOMMESÆKYNGEL |
| C.16. | HONNINGBIER — AKUT ORAL TOKSICITETSTEST |
| C.17. | HONNINGBIER — AKUT KONTAKTTOKSICITETSTEST |
| C.18. | ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGT-METODE |

▼**B**

| | |
|---|---|
| C.19. | BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN ($K_{OC}$) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) |
| C.20. | *DAPHNIA MAGNA* FORMERINGSTEST |
| C.21. | JORDMIKROORGANISMER: KVÆLSTOFOMDANNELSESTEST |
| C.22. | JORDMIKROORGANISMER: KULSTOFOMDANNELSESTEST |
| C.23. | AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I JORD |
| C.24. | AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I AKVATISKE SEDIMENTSYSTEMER |
| C.25. | AEROB MINERALISERING I OVERFLADEVAND — SIMULERET BIONEDBRYDNINGSFORSØG |
| C.26. | *LEMNA* SP. VÆKSTHÆMNINGSTEST |

▼**M4**

| | |
|---|---|
| C.27. | TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET SEDIMENT |
| C.28. | TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET VAND |
| C.29. | LET BIONEDBRYDELIGHED — $CO_2$ I LUKKEDE BEHOLDERE (HEADSPACE-TEST) |
| C.30. | BIOAKKUMULERING I TERRESTRISKE OLIGOCHAETER |

▼B

C.1. **AKUT TOKSICITET FOR FISK**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at bestemme et stofs akutte dødelige toksicitet for ferskvandsfisk. Det er ønskeligt at have flest mulige oplysninger om stoffets vandopløselighed, damptryk, kemiske stabilitet, dissociationskonstanter og bionedbrydelighed, når man skal vælge, med hvilken testmetode (statisk, semistatisk eller gennemløb) der mest hensigtsmæssigt kan opnås tilfredsstillende konstante koncentrationer af teststoffet under testens forløb.

Øvrige oplysninger (f.eks. strukturformel, renhedsgrad, art og procentdel af betydende urenheder, tilstedeværelse og mængde af tilsætningsstoffer, samt n-octanol/vand-fordelingskoefficienten) bør tages i betragtning både ved planlægningen af testen og ved fortolkningen af testresultaterne.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Akut toksicitet er erkendbar skadelig virkning, der fremkaldes hos en organisme inden for kort tid (dage) ved eksponering for et stof. I denne test udtrykkes akut toksicitet som middel dødelig koncentration ($LC_{50}$), dvs, den koncentration i vand, som dræber 50 % af fiskene i en forsøgsgruppe under kontinuerlig eksponering i en vis periode, som skal angives.

Alle koncentrationer af teststoffet er angivet i vægt pr. volumenenhed (mg/l). De kan også udtrykkes i vægtforhold (mg/kg).

1.3. REFERENCESTOFFER

Der kan anvendes et referencestof til at godtgøre, at forsøgsdyrenes følsomhed ikke har ændret sig væsentligt under forsøgsbetingelserne i laboratorier.

Der er ikke specificeret nogen referencestoffer til denne test.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Der kan udføres en grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om $LC_{50}$ er større end denne koncentration.

Fiskene udsættes for teststoffet i vand i en række koncentrationer i 96 timer. Dødeligheden registreres med højst 24 timers mellemrum, og man beregner om muligt de koncentrationer, der på hvert observationstidspunkt dræber 50 % af fiskene ($LC_{50}$).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Kvalitetskriterierne gælder for såvel grænsetesten som den komplette testmetode.

Dødeligheden i kontrolgruppen må ikke overstige 10 % (eller én fisk, hvis der benyttes mindre end ti fisk) ved testens afslutning.

Koncentrationen af opløst oxygen skal være højere end 60 % af mætning gennem hele testen.

▼B

Koncentrationen af teststoffet skal være op til 80 % af startkoncentrationen gennem hele testen.

For stoffer, der let opløses i testmediet og giver stabile opløsninger, dvs. stoffer, der ikke i væsentlig grad fordamper, nedbrydes, hydrolyseres eller adsorberes, kan startkoncentrationen antages at være lig med den nominelle koncentration. Det skal godtgøres, at koncentrationen har været opretholdt gennem hele testen, og at kvalitetskriterierne er opfyldt.

For stoffer, som

i) er tungt opløselige i testmediet eller

ii) kan danne stabile emulsioner eller dispersioner eller

iii) er ustabile i vandig opløsning,

skal der som værdi for startkoncentrationen anvendes den koncentration, som er målt i opløsningen (eller hvis dette ikke er teknisk muligt, målt i vandsøjlen) ved testens begyndelse. Koncentrationen bestemmes efter, at der opnået ligevægt, men førend testfisk kommes i.

I alle disse tilfælde skal yderligere målinger foretages i løbet af testen for at sikre, at koncentrationen har været opretholdt eller kvalitetskriterierne har været opfyldt.

pH må ikke variere med mere end 1 enhed.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der kan anvendes tre typer procedurer:

*Statisk test:*

Toksicitetstest, hvor der ikke foregår gennemløb af testopløsning. (Opløsningerne udskiftes ikke under testens forløb).

*Semi-statisk test:*

Test uden gennemløb af testopløsning, men hvor hele testopløsningen udskiftes med regelmæssige lange mellemrum (f.eks. hver 24. time).

*Gennemstrømningstest:*

Toksicitetstest, hvor vandet i testkamrene løbende udskiftes, og hvor teststoffet transporteres med udskiftnings-vandet.

1.6.1. **Reagenser**

1.6.1.1. *Teststofopløsninger*

Der fremstilles stamopløsninger af den påkrævede styrke ved opløsning af stoffet i deioniseret vand eller vand som beskrevet i 1.6.1.2.

De valgte testkoncentrationer fremstilles ved fortynding af stamopløsningen, Hvis der testes høje koncentrationer, kan stoffet opløses direkte i det vand, der ellers anvendes til fortynding.

▼B

Stoffer testes normalt kun op til opløselighedsgrænsen, For visse stoffer (f.eks. stoffer, som er tungt opløselige i vand, som har en høj $P_{ow}$-værdi, eller som danner en stabil dispersion og ikke en ægte opløsning i vand) kan det accepteres, at der anvendes en testkoncentration, der er større end opløseligheden, så det sikres, at den højeste opløste/stabile koncentration er nået. Det er dog vigtigt, at denne koncentration ikke på anden måde forstyrrer testsystemet (f.eks. dannelse af en hinde af stoffet på vandoverfladen, så vandet ikke iltes, osv.).

Der kan tages ultralyd, organiske opløsningsmidler, emulgatorer eller dispergeringsmidler til hjælp til fremstilling af stamopløsninger af stoffer, der er tungt opløselige i vand, og til dispergering af sådanne stoffer i testmediet. Hvis der anvendes hjælpestoffer, skal alle testkoncentrationer indeholde samme mængde hjælpestof, og der anvendes en ekstra kontrolgruppe, der udsættes for samme koncentration af hjælpestoffet, som er anvendt i testserien. Sådanne hjælpestoffer anvendes i den lavest mulige koncentration, der i hvert tilfælde ikke må være større end 100 mg/l i testmediet.

Testen gennemføres uden justering af pH, Hvis der konstateres en væsentlig pH-ændring, anbefales det at gentage testen med justeret pH, og disse resultater rapporteres. I så fald justeres stamopløsningens pH til samme værdi som i det vand, der anvendes til fortynding, medmindre der er særlige grunde til at undlade dette. Til justering af pH foretrækkes HCl og NaOH. Justering af pH skal foregå på en sådan måde, at koncentrationen af teststof i stamopløsningen ikke ændres væsentligt. Hvis teststoffet reagerer kemisk eller udfældes ved justeringen, rapporteres dette.

1.6.1.2. *Vand til opbevaring og fortynding*

Der kan benyttes drikkevand (ikke forurenet med potentielt skadelige koncentrationer af chlor, tungmetaller eller andre stoffer), råvand af egnet kvalitet eller kunstigt fremstillet ferskvand (se tillæg 1). Der foretrækkes vand med en total hårdhed mellem 10 og 250 mg/l (som $CaCO_3$) og med et pH mellem 6,0 og 8,5.

1.6.2. **Apparatur**

Alt apparatur skal være af kemisk inert materiale.

— automatisk fortyndingssystem (for gennemstrømningstest)

— oxygenmåleudstyr

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed

— passende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter.

1.6.3. **Testfisk**

Fiskene skal være i god helbredstilstand og uden synlige misdannelser.

▼B

Arterne udvælges på grundlag af praktiske kriterier såsom, om de er til rådighed hele året, hvor lette de er at holde, om de er egnede til testning, og hvor følsomme de er, samt andre økonomiske, biologiske og økologiske faktorer af betydning. Hensynet til dataenes sammenlignelighed og den allerede gennemførte internationale harmonisering (henvisning (1)) bør ligeledes tages i betragtning ved valg af fiskearterne.

Tillæg 2 indeholder en liste over de fiskearter, der anbefales til gennemførelse af denne test; zebrafisk og regnbueørred foretrækkes.

1.6.3.1. *Opbevaring*

Testfisk skal fortrinsvis komme fra en enkelt bestand og være af samme længde og alder. Fiskene skal holdes i mindst 12 dage under følgende betingelser:

*Belastning:*

Passende for systemet (recirkulation eller gennemstrømning) og fiskearten.

*Vand:*

Se 1.6.1.2.

*Lys:*

12 til 16 timers lys dagligt.

*Koncentration af opløst oxygen:*

Mindst 80 % mætning.

*Fodring:*

Dagligt eller tre gange ugentligt, sidste gang 24 timer før testen påbegyndes.

1.6.3.2. *Dødelighed*

Efter en 48 timers tilpasningsperiode registreres dødeligheden, og følgende kriterier anvendes;

— større end 10 % af populationen på syv dage:

Hele partiet kasseres

— mellem 5 og 10 % af populationen:

Observationsperioden forlænges med yderligere syv dage.

Hvis der ikke sker flere dødsfald, accepteres partiet; i modsat fald må det kasseres

— mindre end 5 % af populationen:

Partiet accepteres.

1.6.4. **Tilvænning**

Alle fisk skal udsættes for vand af den kvalitet og med den temperatur, som vil blive anvendt i testen, i mindst syv dage, før de tages i anvendelse.

▼B

1.6.5. **Testens udførelse**

Forud for den endelige test kan der udføres en indledende test med det formål at skaffe oplysninger om, hvilke koncentrationer der skal anvendes i den endelige test.

Ud over testserien medtages en kontrolgruppe uden teststof og i givet fald en kontrolgruppe med hjælpestof.

Der vælges en statisk test, en semi-statisk test eller en gennemstrømningstest alt efter teststoffets fysiske og kemiske egenskaber, idet den bedst egnede til opfyldelse af kvalitetskriterierne vælges.

Fiskene udsættes for stoffet, som beskrevet nedenfor:

— varighed: 96 timer

— antal dyr: mindst 7 pr, koncentration

— kar: af passende størrelse i forhold til den anbefalede belastning

— belastning: For statiske og semi-statiske test anbefales 1 g/l som den maksimale belastning; for gennemstrømningstest kan større belastning accepteres

— testkoncentration: mindst fem koncentrationer med et konstant indbyrdes forhold på ikke over 2,2, som så vidt muligt dækker hele dødelighedsintervallet fra 0 til 100 %

— vand: se 1.6.1.2

— lys: 12 til 16 timers lys dagligt

— temperatur: passende for arten (tillæg 2) men inden for ± 1 °C i den enkelte test

— koncentration af opløst oxygen: ikke mindre end 60 % af mætning ved den valgte temperatur

— fodring: ingen.

Fiskene inspiceres efter de første 2 til 4 timer og derefter med højst 24 timers mellemrum. Fisk betragtes som døde, hvis berøring af haleroden ikke giver nogen reaktion og der ikke er synlige respirationsbevægelser. Døde fisk fjernes, når de observeres, og dødeligheden registreres. Synlige abnormaliteter (f.eks. tab af ligevægt, ændringer i svømmeadfærd, respirationsbevægelser og pigmentering) registreres.

pH, opløst oxygen og temperatur måles dagligt.

*Grænsetest*

En grænsetest med 100 mg/l til konstatering af, om $LC_{50}$ er større end denne koncentration kan anvendes, hvis den fremgangsmåde, som er anført i denne testmetode, benyttes,

Hvis stoffet er af en sådan art, at der ikke kan opnås en koncentration på 100 mg/l i testvandet, udføres grænsetesten ved stoffets mætningskoncentration (eller den højeste koncentration, ved hvilken der dannes en stabil dispersion) i det anvendte medium (se også 1.6.1.1).

▼B

Grænsetesten udføres med 7-10 fisk og en eller to kontrolgrupper af samme størrelse. (Ifølge binomialteorien er der ved anvendelse af 10 fisk 99,9 % sikkerhed for, at $LC_{50}$ er større end den anvendte koncentration, hvis dødeligheden er nul. Med 7, 8 eller 9 fisk giver en dødelighed på nul 99 % sikkerhed for, at $LC_{50}$ er større end den anvendte koncentration).

Hvis der sker dødsfald, må der gennemføres en komplet undersøgelse. Eventuelle subletale virkninger registreres.

2. **DATA OG EVALUERING**

For hvert af de tidspunkter, hvor der er foretaget observationer (efter 24, 48, 72 og 96 timer), afsættes den procentvise dødelighed mod koncentrationen på logaritmisk sandsynlighedspapir.

For hvert observartionstidspunkt skønnes om muligt $LC_{50}$ og konfidensgrænserne (p = 0,05) ved hjælp af standardprocedurer; disse værdier afrundes til ét, eller højst to betydende cifre (eksempler på afrunding til to cifre: 173,5 til 170; 0,127 til 0,13; 1,21 til 1,2).

I de tilfælde, hvor hældningen af koncentration/responsprocentkurven er for stejl til, at $LC_{50}$ kan beregnes, er et skøn ud fra kurven tilstrækkeligt.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et indbyrdes forhold på 2,2 giver en dødelighed på 0 og 100 %, er disse to værdier tilstrækkelige til angivelse af, i hvilket interval $LC_{50}$ ligger.

Hvis det bemærkes, at teststoffet ikke kan holdes stabilt eller homogent, skal dette anføres, og resultaterne må fortolkes med forsigtighed.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— oplysninger om testfisk (videnskabeligt navn, stamme, leverandør, eventuel forbehandling, størrelse samt hvor mange der er anvendt ved hver restkoncentration)

— hvor det vand, der er anvendt til fortynding, kommer fra og dets vigtigste kemiske egenskaber (pH, hårdhed og temperatur)

— for stoffer, der er tungtopløselige i vand, hvilken metode der er anvendt til fremstilling af stam- og testopløsning

— koncentrationen af eventuelle hjælpestoffer

— en liste over de anvendte koncentrationer og alle foreliggende oplysninger om testkemikaliets stabilitet i testopløsningen ved disse koncentrationer

— metoder og resultater, hvis der er udført kemiske analyser

— resultaterne af en eventuel grænsetest

— begrundelse for og detaljer vedrørende den valgte testprocedure (f.eks. statisk, semi-statisk, doseringshastighed, gennemstrømningshastighed, beluftning, antal fisk, osv.)

▼B

— beskrivelse af testudstyret

— lysforhold

— koncentrationen af opløst oxygen, pH og temperatur i testopløsningerne hver 24. time

— godtgørelse af, at kvalitetskriterierne er opfyldt

— en tabel med den kumulative dødelighed for hver koncentration og for kontrolgruppen (samt i givet fald for kontrolgruppen med hjælpestof) på alle de anbefalede observationstidspunkter

— afbildning af koncentration/responsprocentkurve ved testens afslutning

— om muligt $LC_{50}$-værdier på alle de anbefalede observationstidspunkter (med 95 % konfidensgrænser)

— hvilke statistiske metoder der er anvendt til bestemmelse af $LC_{50}$

— hvis der er benyttet et referencestof, de fundne resultater

— højeste testkoncentration, der ikke forårsager nogen dødsfald inden for testperioden

— laveste testkoncentration, der forårsager 100 % dødelighed inden for testperioden.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxidty of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Brachydanio rerio* Harailton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae).* Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia recticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency. Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians, The Committee on Methods for Toxidty Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrenvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P, und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die ökotoxikologische Bewertung von Umwekchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J., Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an $LC_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelinck). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an $LC_{50}$. US EPA.

▼B

*Tillæg 1*

**Kunstigt fremstillet ferskvand**

*Eksempel på vand egnet til fortynding*

Alle kemikalier skal være af analysekvalitet.

Vandet skal være destilleret vand af god kvalitet eller deioniseret vand med en ledningsevne på mindre end 5 $\mu Scm^{-1}$.

Vanddestillationsapparatet må ikke indeholde dele af kobber.

*Stamopløsninger*

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$ — $2H_2O$ (calciumchlorid dihydrat): | 11,76 g |
| opløses i vand og fortyndes til 1 liter | |
| $MgSO_4$ — $7H_2O$ (magnesiumsulfat heptahydrat): | 4,93 g |
| opløses i vand og fortyndes til 1 liter | |
| $NaHCO_3$ (natriumhydrogencarbonat): | 2,59 g |
| opløses i vand og fortyndes til 1 liter | |
| KC1 (kaliumchlorid): | 0,23 g |
| opløses i vand og fortyndes til 1 liter | |

*Kunstigt fremstillet ferskvand til fortynding*

25 ml af hver af de fire stamopløsninger blandes, og der fortyndes til 1 liter med vand.

Opløsningen beluftes, indtil koncentrationen af opløst oxygen svarer til værdien ved mætning.

pH skal være 7,8 ± 0,2.

Om nødvendigt justeres pH med NaOH (natriumhydroxid) eller HC1 (saltsyre).

Det således fremstillede vand til fortynding henstår i ca. 12 timer og beluftes ikke yderligere.

Summen af Ca- og Mg-ioner i denne opløsning er 2,5 mmol/l. Forholdet mellem Ca- og Mg-ioner er 4:1 og mellem Na- og K-ioner 10:1. Opløsningens totale alkalinitet er 0,8 mmol/l.

Afvigelser ved fremstillingen af fortyndingsvandet må ikke medføre ændringer i vandets sammensætning og egenskaber.

▼B

*Tillæg 2*

**Fiskearter, der anbefales til testning**

| Anbefalede aner | Anbefalet temperaturinterval ( °C) | Anbefalet længde af testdyr (cm) |
|---|---|---|
| *Bracbydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) Zebrafisk | 20 til 24 | 3,0 ± 0,5 |
| *Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae)* (Rafinesque) Fathead minnow | 20 til 24 | 5,0 ± 2,5 |
| *Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus 1758) Karpe | 20 til 24 | 6,0 ± 2,0 |
| *Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae)* Cyprinodontidae(Tomminck og Schlegel 1850) japansk risfisk | 20 til 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae)* (Peters 1859) Guppy | 20 til 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae*) (Rafinesque Linnaeus 1758) | 20 til 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae)* (Walbaum 1988) Regenbueørred | 12 til 17 | 6,0 ± 2,0 |
| *Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus 1758) Guldfisk | 20 til 24 | 6,0 ± 2,0 |

**Opdrætsbetingelser**

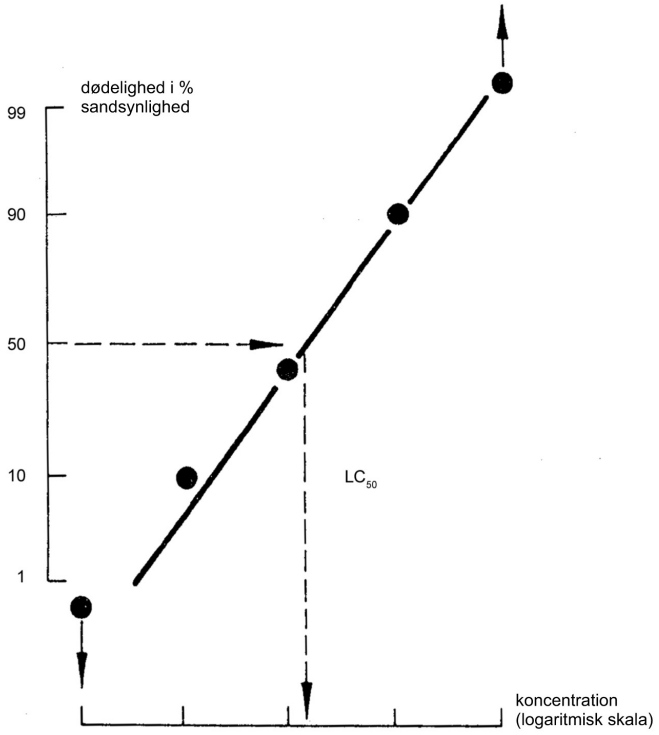
De ovenfor nævnte fisk er lette at opdrætte og/eller let tilgængelige hele året rundt. De kan opdrættes enten i dambrug eller i laboratoriet under sygdoms- og parasitfrie forhold, sådan at forsøgsdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk er tilgængelige i store dele af verden.

▼B

*Tillæg 3*

**Eksempel på kurve over koncentration mod dødelighed**

Eksempel på bestemmelse af $LC_{50}$ på log/sandsynlighedspapir



▼B

## C.2. DAPHNIA SP. AKUT IMMOBILISATIONSTEST

### 1. METODE

Den her beskrevne akutte immobilisationstest er ækvivalent med OECD TG 202 (2004).

### 1.1. INDLEDNING

Metoden beskriver en akut toksicitetstest til vurdering af kemiske stoffers virkning på dafnier. Så vidt muligt er anvendt eksisterende testmetoder (1)(2)(3).

### 1.2. DEFINITIONER

I forbindelse med denne metode anvendes følgende definitioner:

**$EC_{50}$:** er den koncentration, der er fundet at immobilisere 50 % af dafnierne i løbet af en nærmere angivet eksponeringsperiode. Benyttes en anden definition, skal dette angives tillige med den tilhørende henvisning.

**Immobilisering:** Dyr, der ikke er i stand til at svømme inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af testkarret, anses for at være immobiliseret (uanset om de stadig kan bevæge antennerne).

### 1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Unge dafnier, som ved testens begyndelse er mindre end 24 timer gamle, eksponeres for forskellige koncentrationer af prøvestoffet i et tidsrum af 48 timer. Ved 24 og 48 timer registreres immobiliseringen, og der sammenholdes med kontrolværdier. Resultaterne analyseres med henblik på beregning af $EC_{50}$ ved 48h (se definitioner i punkt 1.2). Bestemmelse af $EC_{50}$ ved 24h er ikke obligatorisk.

### 1.4. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Prøvestoffets vandopløselighed og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af stoffet i prøveopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode med dokumenteret genfindingsgrad og bestemmelsesgrænse. Nyttige oplysninger om stoffet er dets strukturformel, renhed, stabilitet i vand og over for lys, $P_{ow}$ samt resultater af en nedbrydelighedstest (se metode C.4).

*Anm.:* For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysiske-kemiske egenskaber, er der vejledning i (4).

### 1.5. REFERENCESTOFFER

Der kan testes et referencestof for $EC_{50}$ for at sikre, at forsøgsbetingelserne er pålidelige. Hertil anbefales det at benytte de giftstoffer, der anvendes i internationale ringtest ([1]) (1)(5). Test med referencestof bør helst finde sted hver måned og mindst to gange årligt.

([1]) Ifølge resultaterne af sådanne ringtest og en teknisk berigtigelse af ISO 6341 ligger $EC_{50}$ — 24 h for kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) mellem 0,6 mg/l og 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITETSKRITERIER

Følgende præstationskriterier tjener til at afgøre om en test er gyldig:

— i kontrolprøverne, herunder kontrollen indeholdende opløsningsmidlet, må højst 10 % af dafnierne blive immobiliseret

— koncentrationen af opløst oxygen skal ved testens afslutning være ≥ 3 mg/l i kontrol- og testkar.

*Anm.:* Med henblik på det første kriterium må højst 10 % af kontroldafnierne udvise immobilisering eller andre tegn på sygdom eller stress såsom affarvning eller usædvanlig adfærd som f.eks. fastsidden i vandoverfladen.

1.7. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.7.1. **Apparatur**

Testkar og andet apparatur, der kommer i berøring med prøveopløsningerne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Som testkar anvendes normalt reagensglas eller bægerglas; hver gang disse anvendes, skal de forinden være rengjort med sædvanlige laboratoriemetoder. Testkarrene skal være løst tildækket for at mindske vandtab ved fordampning og for at undgå, at der kommer støv i opløsningerne. Flygtige stoffer testes i helt fyldte lukkede kar, der er store nok til at forhindre at oxygenkoncentrationen bliver en begrænsende faktor eller for lav (se punkt 1.6 og punkt 1.8.3, første afsnit).

Derudover anvendes der et eller flere af følgende udstyr: oxygenmeter (med mikroelektrode eller andet egnet udstyr til måling af opløst oxygen i prøver med lille volumen); pH-meter; egnet apparatur til temperaturregulering; udstyr til bestemmelse af total mængde organisk kulstof (TOC); udstyr til bestemmelse af kemisk iltforbrug (COD); udstyr til bestemmelse af hårdhed osv.

1.7.2. **Testorganisme**

Daphnia magna Straus er den foretrukne art, men andre egnede *Daphnia*-arter kan anvendes (f.eks. Daphnia pulex). Ved testens begyndelse skal dyrene være under 24 timer gamle, og for at mindske variabiliteten anbefales det stærkt, at man ikke anvender første kuld afkom. Dyrene skal hidrøre fra en sund bestand (dvs. fri for tegn på stress som høj dødelighed, tilstedeværelse af hanner og ephippia, forsinket frembringelse af første kuld, affarvede dyr osv.). Alle organismer, der anvendes i en given test, skal udgå fra kulturer etableret fra samme bestand af dafnier. Dyrene i bestanden skal holdes under vækstbetingelser (lys, temperatur, medium) svarende til de i testen anvendte. Skal der til testen benyttes et andet vækstmedium end de sædvanligvis anvendte vækstmedier til dafnier, er det god praksis at anvende en akklimatiseringsperiode inden testen. Denne består i, at dafnier fra kuldet opholder sig i fortyndingsvand ved testtemperaturen i mindst 48 timer, inden testen begynder.

▼B

1.7.3. **Opbevarings- og fortyndingsvand**

Som opbevarings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand eller afkloret ledningsvand, såfremt dafnier kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings-, akklimatiserings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Vand er egnet som testvand, når det er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for fortyndingsvand i bilag 1. Vandets kvalitet skal være konstant under hele testen. Rekonstitueret vand kan fremstilles ved, at deioniseret eller destilleret vand tilsættes nærmere bestemte mængder reagenser af anerkendt analysekvalitet. Eksempler på rekonstitueret vand er givet i (1) og (6) og i bilag 2. Det skal bemærkes, at metalholdige stoffer ikke bør testes med medier indeholdende kendte chelaterende stoffer som M4- og M7-medierne i bilag 2. pH skal være mellem 6 og 9. Til *Daphnia magna* anbefales en hårdhed på mellem 140 og 250 mg/l (som $CaCO_3$), men mindre hårdhed kan også være hensigtsmæssig til andre arter af Daphnia. Fortyndingsvandet kan luftes inden dets anvendelse i testen, så det er mættet med opløst oxygen.

Anvendes råvand, skal kvalitetsparametrene måles mindst to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt (se foregående afsnit og bilag 1). Måling af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) skal ligeledes foretages. Anvendes afkloret ledningsvand, er daglig chlorbestemmelse ønskelig. Hidrører fortyndingsvandet fra overflade- eller grundvand, skal dets ledningsevne og totale organiske kulstofindhold (TOC) eller kemiske iltforbrug (COD) bestemmes.

1.7.4. **Testopløsninger**

Sædvanligvis fremstilles testopløsningerne i de valgte koncentrationer ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger skal fortrinsvis fremstilles ved opløsning af prøvestoffet i fortyndingsvandet. Brug af opløsningsmidler, emulgatorer og dispergeringsmidler skal så vidt muligt undgås. I visse tilfælde kan sådanne forbindelser dog være nødvendige for at få en tilpas koncentreret stamopløsning. Vejledning om egnede opløsningsmidler, emulgatorer og dispergeringsmidler er givet i (4). I alle tilfælde må indholdet af prøvestof i testopløsningerne ikke overstige stoffets opløselighed i fortyndingsvandet.

Testen skal udføres uden justering af pH. Hvis pH ikke holder sig i området 6-9, kan der efterfølgende foretages endnu en test, hvor stamopløsningens pH er justeret til pH af fortyndingsvandet, før prøvestof tilsættes. pH-justeringen skal ske således, at stamopløsningens koncentration ikke ændres nævneværdigt, og så det ikke forårsager en kemisk reaktion eller udfældning af prøvestoffet. HCl og NaOH må foretrækkes.

▼B

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.8.1.1. *Testgrupper og kontrolgrupper*

Testkarrene påfyldes det korrekte rumfang fortyndingsvand og prøvestofopløsning. Luft/vand-volumenforholdet i karret skal være ens i test- og kontrolgruppen. Dafnierne overføres derefter til testkarrene. For hver testkoncentration og til kontrol skal anvendes mindst 20 dyr, helst opdelt i fire grupper på hver fem dyr. Der skal være mindst 2 ml testopløsning for hvert dyr (altså 10 ml til fem dafnier pr. testkar). Er prøvestofkoncentrationen ikke stabil, kan testen udføres i et system med halvstatisk udskiftning eller et gennemstrømningssystem.

Foruden behandlingsserien testes én kontrolserie med fortyndingsvand og én kontrolserie indeholdende et eventuelt opløsningsmiddel.

1.8.1.2. *Testkoncentrationer*

Der kan udføres et forberedende forsøg til fastlæggelse af koncentrationsområdet for den endelige test, medmindre oplysninger om prøvestoffets toksicitet allerede foreligger. Herunder eksponeres dafnierne for en række vidt forskellige koncentrationer af prøvestoffet. Fem dafnier eksponeres for hver testkoncentration i op til 48 timer, og flerdobbeltbestemmelse er ikke nødvendigt. Eksponeringsperioden kan afkortes (f.eks. til 24 timer eller derunder), hvis egnede data i det forberedende forsøg kan opnås på kortere tid.

Der skal anvendes mindst fem testkoncentrationer. Disse vælges som en kvotientrække med en kvotient på helst ikke over 2,2. Anvendes færre end fem koncentrationer, skal dette begrundes. Den højeste testede koncentration skal helst medføre 100 % immobilisering, mens den laveste helst ikke må medføre nogen observerbar effekt.

1.8.1.3. *Inkuberingsbetingelser*

Temperaturen skal være mellem 18 °C og 22 °C og skal i den enkelte test være konstant inden for ± 1 °C. En cyklus bestående af 16 timers lys og 8 timers mørke anbefales. Fuldstændigt mørke er også acceptabelt, specielt for prøvestoffer, der er ustabile i lys.

Testkarrene må ikke beluftes under testen. Testen udføres uden justering af pH. Dafnierne må ikke fodres under testen.

1.8.1.4. *Varighed*

Testens varighed er 48 timer.

1.8.2. **Bemærkninger**

Hvert testkar kontrolleres for immobiliserede dafnier 24 og 48 timer efter testens begyndelse. (se definitionerne i punkt 1.2). Ud over immobilitet rapporteres om al unormal adfærd eller fremtræden.

▼B

1.8.3. **Analytiske målinger**

Ved testens begyndelse og slutning måles opløst oxygen og pH i kontrolprøve(r) og i den højeste prøvestofkoncentration. Koncentrationen af opløst oxygen i kontrollerne skal være i overensstemmelse med validitetskriteriet (se punkt 1.6). pH må normalt ikke variere mere end 1,5 enhed i nogen enkelt test. Temperaturen måles sædvanligvis i kontrolkarrene eller i den omgivende luft og skal helst registreres kontinuerligt under testen eller i det mindste ved testens begyndelse og slutning.

Prøvestofkoncentrationen måles i det mindste ved den højeste og laveste prøvestofkoncentration ved testens begyndelse og slutning (4). Det anbefales at resultaterne baseres på de målte koncentrationer. Hvis prøvestofkoncentrationen kan dokumenteres at have været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration under hele testen, kan resultaterne dog baseres på de nominelle eller målte begyndelsesværdier.

1.9. GRÆNSETEST

Med den i denne metode beskrevne fremgangsmåde kan udføres en grænsetest ved en prøvestofkoncentration på 100 mg/l, dog ikke højere end stoffets opløselighed i testmediet, med henblik på at godtgøre at $EC_{50}$ er større end denne koncentration. Til grænsetesten anvendes 20 dafnier (helst opdelt i fire grupper på hver fem dyr), og samme antal kontroldyr. Hvis der forekommer immobilisering, udføres en fuld undersøgelse. Al observeret unormal adfærd registreres.

2. **DATA**

Data sammenfattes i tabeller, der for hver behandlings- og kontrolgruppe viser det anvendte antal dafnier og immobiliserede dyr ved hver observation. Der optegnes en kurve over procentdel immobiliserede dyr ved 24 timer og 48 timer som funktion af prøvestofkoncentrationen. Der anvendes passende statistiske metoder (f.eks. probabalistisk analyse osv.) til beregning af kurvehældninger og $EC_{50}$ med 95 % konfidensintervaller (p = 0,05) (7) (8).

Når standardmetoder til beregning af $EC_{50}$ ikke kan anvendes på de målte data, benyttes den højeste koncentration, der ikke medfører immobilitet, og den laveste koncentration, der medfører 100 % immobilitet, til tilnærmet beregning af $EC_{50}$ (idet denne sættes til det geometriske gennemsnit af de to koncentrationer).

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende:

Teststof:

— fysisk form og, når det er relevant, fysiske-kemiske egenskaber

▼B

— kemiske identifikationsdata, herunder renhed.

Den testede dyreart:

— kilde til og art af Daphnia, leverandør af kilden (hvis den kendes) og anvendte vækstbetingelser (herunder foderets oprindelse, art og mængde samt fodringshyppighed).

Testbetingelser:

— beskrivelse af testkarrene: karrenes art, opløsningens volumen, antal dafnier pr. testkar, antal testkar (gentagelser) pr. koncentration

— metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler, samt anvendte koncentrationer

— oplysninger om fortyndingsvandet: oprindelse og kvalitetskarakteristika (pH, hårdhed, Ca/Mg-forhold, Na/K-forhold, alkalinitet, ledningsevne osv.); hvis rekonstitueret vand anvendes, dettes sammensætning

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, opløst oxygen, pH osv.

Resultater:

— antal og procentdel dafnier, der er blevet immobiliseret eller udviser negativ påvirkning (herunder unormal opførsel) i kontroldyrene og i hver behandlingsgruppe, på hvert observationstidspunkt, samt beskrivelse af arten af de iagttagne virkninger

— resultater og dato for test udført med referencestof, hvis de foreligger

— nominelle prøvekoncentrationer og resultat af alle analyser til bestemmelse af prøvestofkoncentrationen i testkarrene; metodens genfindingsgrad og bestemmelsesgrænse skal ligeledes rapporteres

— alle fysiske-kemiske målinger af temperatur, pH og opløst oxygen, som er foretaget under testen

— $EC_{50}$ ved 48 h for immobilisering, med konfidensintervaller og kurver over den tilpassede model, der anvendt til beregning heraf, dosis-responskurvers hældning og middelfejlen herpå; statistiske metoder, der er anvendt til bestemmelse af $EC_{50}$; (tilsvarende data vedrørende immobilisering ved 24 h skal ligeledes rapporteres, når de er målt)

— forklaring vedrørende eventuel afvigelse fra testmetoden, og hvorvidt afvigelsen påvirkede testresultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/1 1. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an $LC_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. Pp. 65-84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

*Bilag 1*

**NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA AF ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND**

| Stof | Koncentration |
|---|---|
| Partikler | < 20 mg/l |
| Total mængde organisk kulstof (TOC) | < 2 mg/l |
| Ikke-ioniseret ammoniak | < 1 µg/l |
| Chloroverskud | < 10 µg/l |
| Total mængde organiske fosforpesticider | < 50 ng/l |
| Total mængde organiske chlorpesticider plus polychlorerede biphenyler | < 50 ng/l |
| Total mængde organisk chlor | < 25 ng/l |

▼B

*Bilag 2*

## EKSEMPLER PÅ VELEGNET REKONSTITUERET TESTVAND

### ISO-testvand (1)

| Stamopløsninger (enkeltstof) | | Rekonstitueret vand fremstilles ved tilsætning af følgende rumfang stamopløsninger til 1 liter vand (*) |
|---|---|---|
| Stof | Mængde tilsat til 1 liter vand (*) | |
| Calciumchlorid<br>$CaCl_2$, $2H_2O$ | 11,76 g | 25 ml |
| Magnesiumsulfat<br>$MgSO_4$, $7H_2O$ | 4,93 g | 25 ml |
| Natriumbicarbonat<br>$NaHCO_3$ | 2,59 g | 25 ml |
| Kaliumchlorid<br>KCl | 0,23 g | 25 ml |

(*) Vand af passende renhed, f.eks. deioniseret, destilleret eller behandlet ved omvendt osmose, fortrinsvis med ledningsevne ikke over 10 $\mu S.cm^{-1}$.

### Elendt medium M7 og M4

**Akklimatisering til Elendt medium M4 og M7**

I nogle laboratorier har det medført problemer at overføre dafnier direkte til M4- og M7-medium. Dog er med noget held anvendt gradvis akklimatisering, dvs. flytning fra eget medium til 30 % Elendt efterfulgt af 60 % Elendt og derefter 100 % Elendt. En akklimatiseringsperiode på helt op til en måned kan være nødvendig.

**Fremstilling**

*Mikronæringsstoffer*

Først fremstilles der separate stamopløsninger (I) af hvert mikronæringsstof i vand af passende renhed, f.eks. deioniseret, destilleret eller behandlet ved omvendt osmose. Af disse forskellige stamopløsninger (I) fremstilles én enkelt stamopløsning (II) indeholdende alle mikronæringsstoffer (kombineret opløsning), dvs.:

| Stamopløsning(er) I (enkeltstof) | Mængde tilsat til vand (mg/l) | Koncentration (i forhold til medium M4) | Til fremstilling af den kombinerede stamopløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 7 210 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |

▼B

| Stamopløsning(er) I (enkeltstof) | Mængde tilsat til vand (mg/l) | Koncentration (i forhold til medium M4) | Til fremstilling af den kombinerede stamopløsning II tilsættes følgende mængde stamopløsning I til vand (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2.6H_2O$ | 3 040 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| $Na_2\ MoO_4.2H_2O$ | 1 230 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2.2H_2O$ | 335 | 20 000 gange | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 200 | 20 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| Kl | 65 | 20 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2\ SeO_3$ | 43,8 | 20 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 20 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2$ EDTA.$2H_2O$ | 5 000 | 2 000 gange | — | — |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 1 991 | 2 000 gange | — | — |

De to opløsninger af $Na_2$ EDTA og $FeSO_4$ fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

Derved fås:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 l Fe-EDTA opløsning | | 1 000 gange | 20,0 | 5,0 |

M 4 - o g M 7 - m e d i u m

M4- og M7-medierne fremstilles af stamopløsning II, makronæringsstoffer og vitaminer på følgende måde:

| | Mængde tilsat til vand (mg/l) | Koncentration (i forhold til medium M4) | Mængde stamopløsning II tilsat til fremstilling afmediet (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Stamopløsning II (kombinerede sporstoffer) | | 20 gange | 50 | 50 |
| Stamopløsninger af makronæringsstoffer (enkeltstof) | | | | |
| $CaCl_2 \cdot 2H_20$ | 293 800 | 1 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246 600 | 2 000 gange | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000 gange | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000 gange | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$ | 50 000 | 5 000 gange | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000 gange | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000 gange | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000 gange | 0,1 | 0,1 |

▼B

| | Mængde tilsat til vand (mg/l) | Koncentration (i forhold til medium M4) | Mængde stamopløsning II tilsat til fremstilling afmediet (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Kombineret vitamin-stamopløsning | — | 10 000 gange | 0,1 | 0,1 |

Den kombinerede vitamin-stamopløsning fremstilles ved tilsætning af de tre vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 10 000 gange | | |
| Cyanocobalamin ($B_{12}$) | 10 | 10 000 gange | | |
| Biotin | 7,5 | 10 000 gange | | |

Den kombinerede vitamin-stamopløsning opbevares nedfrosset i små aliquoter. Vitaminer tilsættes til medierne kort inden disse anvendes.

NB: For at undgå saltudfældning ved fremstilling af de komplette medier tilsætter man først aliquoterne af stamopløsningerne til 500-800 ml deioniseret vand, hvorefter der fyldes op til 1 liter.

NB: M4-mediet blev første gang beskrevet i Elendt, B. P. (1990): Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M1

## C.3. FERSKVANDSALGER OG CYANOBAKTERIER, VÆKSTHÆMNINGSTEST

### 1. METODE

Metoden er ækvivalent med OECD TG 201 (2006) (1).

### 1.1. INDLEDNING

Testmetoderne bliver med mellemrum gennemgået og ajourført på baggrund af den videnskabelige udvikling. Der er nødvendigt at revidere testmetode C.3, således at den omfatter flere arter og opfylder kravene til risikovurdering og klassificering af kemiske stoffer. Revisionen er foretaget på grundlag af de omfattende praktiske erfaringer med testen, den videnskabelige udvikling inden for algetoksicitetsundersøgelser samt de kontrollerende myndigheders udstrakte anvendelse af testen, siden denne oprindeligt blev indført.

### 1.2. DEFINITIONER

I denne testmetode anvendes følgende definitioner og forkortelser:

**Biomasse**, den tørre vægt af levende materiale, som er til stede i en population, i et givet volumen, f.eks. mg alger/liter testopløsning. »Biomasse« defineres sædvanligvis som masse, men skal i denne test forstås som masse pr. volumenenhed. I denne test anvendes typisk målinger af surrogater for biomasse som f.eks. celletal, fluorescens mv., hvorfor betegnelsen »biomasse« ligeledes dækker disse surrogatmåleværdier.

**Variationskoefficient**, et dimensionsløst mål for variabiliteten af en parameter, defineret som forholdet mellem standardafvigelsen og middelværdien. Den kan også angives i procent. Middelværdien af variationskoefficienten for den gennemsnitlige specifikke vækst-hastighed i replikate kontrolkulturer beregnes som følger:

1. Variationskoefficienten beregnes som % af den gennemsnitlige specifikke vækshastighed ved hjælp af de trinvist beregnede daglige vækstrater for den pågældende replikat.

2. Der beregnes et gennemsnit af alle værdier beregnet i punkt 1. Deraf fås den gennemsnitlige variationskoefficient for den beregnede trinvise daglige specifikke vækstrate i replikate kontrolkulturer.

**ECx**, den koncentration af teststof opløst i testsubstratet, der medfører en vækshæmning på x % (f.eks. 50 %) af testorganismen inden for en angiven eksponeringsperiode (som angives udtrykkeligt, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For entydigt at skelne mellem EC-værdier afledt af vækstrate (»rate«) eller af udbytte (»yield«) benyttes de respektive symboler »$E_rC$« og »$E_yC$«.

**Næringssubstrat**, det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvori algerne vokser, når de eksponeres for teststoffet. Teststoffet vil normalt være opløst i testsubstratet.

**Vækshastighed** (**gennemsnitlig specifik vækshastighed**), den logaritmiske stigning i biomasse i eksponeringsperioden.

▼M1

**Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC)**, den laveste testede koncentration, ved hvilken stoffet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrolprøverne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning mindst svarende til den, der iagttages ved LOEC. Er disse to betingelser ikke opfyldt, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

**Nuleffekt-koncentration (No Observed Effect Concentration (NOEC))**, testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

**Responsvariabel**, en variabel, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af vilkårlige målte parametre, der beskriver biomassen ved andre beregningsmetoder. I nærværende metode er vækstrater og udbytte responsvariabler, der er afledt ved måling af biomasse direkte eller af et af de nævnte surrogater.

**Specifik væksthastighed**, en responsvariabel, der er defineret som forholdet mellem ændringen i den naturlige logaritme til en observationsparameter (i nærværende testmetode, biomasse) og det tilsvarende tidsrum.

**Udbytte**, værdien af en målevariabel ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variablen ved eksponeringsperiodens start, dvs. stigningen i biomasse under testen.

1.3. TESTMETODENS ANVENDELIGHED

Metoden er bedst anvendelig på vandopløselige stoffer, som under forsøgsbetingelserne forventes at forblive i vandet. Til testning af stoffer, der er flygtige, stærkt adsorberende, farvede eller tungtopløselige i vand, eller som kan ændre tilgængeligheden af næringsstoffer eller mineraler i testsubstratet, kan visse ændringer af den beskrevne fremgangsmåde være nødvendige (f.eks. lukket system eller konditionering af testbeholderne). Anvisninger for nogle sådanne ændringer er givet i (2) (3) (4).

1.4. TESTENS PRINCIP

Testens formål er at bestemme teststoffets påvirkning af væksten af ferskvandsmikroalger og/eller cyanobakterier. Testorganismer i eksponentiel vækst eksponeres for teststoffet i batchkulturer i et tidsrum af normalt 72 timer. Til trods for testens forholdsvis korte varighed giver den mulighed for at vurdere virkningerne på flere generationer.

Systemets respons er vækshæmningen i en række algekulturer (testenheder), der eksponeres for forskellige koncentrationer af et teststof. Responsen udtrykkes som funktion af eksponeringskoncentrationen og sammenholdes med gennemsnitsvæksten i replikate, ikke eksponerede kulturer. For at systemets respons på toksiske virkninger kan komme fuldt til udtryk (optimal følsomhed), lader man kulturerne vokse uhæmmet eksponentielt med tilstrækkelige næringsstoffer og kontinuerlig belysning tilstrækkelig længe til, at hæmningen af den specifikke vækshastighed kan måles.

▼M1

Vækst og væksthæmning bestemmes kvantitativt ved måling af algebiomassen som funktion af tiden. Algebiomasse defineres som tør vægt pr. volumenenhed, f.eks. mg alger/liter testopløsning. Tør vægt er imidlertid vanskelig at måle, hvorfor der anvendes surrogatparametre. Af sådanne surrogater er celletal det mest anvendte. Andre surrogatparametre er cellevolumen, fluorescens, optisk tæthed mv. Omregningsfaktoren mellem den målte surrogatparameter og biomassen skal være kendt.

Endepunktet for testen er væksthæmning, udtrykt som logaritmisk stigning i biomasse (gennemsnitlig specifik vækshastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke vækshastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og denne udtrykkes som $E_rC_x$ (f.eks. $E_rC_{50}$).

Når denne metode anvendes i forbindelse med EU-lovgivningen, skal resultaterne beregnes på grundlag af den gennemsnitlige specifikke vækshastighed af de grunde, der er anført i punkt 2.2. I metoden anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelser i visse stater. Udbyttet defineres som biomassen ved eksponeringsperiodens slutning minus biomassen ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning x % (f.eks. 50 %) i udbyttet, og denne angives som $E_yC_x$ (f.eks. $E_yC_{50}$).

Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffekt-koncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

1.5. OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Med henblik på fastsættelse af testbetingelser vil det være nyttigt at kende teststoffets strukturformel, renhed, lysstabilitet, stabilitet under testbetingelserne, lysabsorptionsegenskaber, pKa og resultaterne af omdannelsesundersøgelser, herunder bionedbrydeligheden i vand.

Teststoffets vandopløselighed, octanol/vand-fordelingskoefficient ($P_{ow}$) og damptryk skal være kendt, og til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testopløsningerne skal der foreligge en pålidelig analysemetode, hvis genfindingsevne og detektionsgrænse rapporteres.

1.6. REFERENCESTOF

Til kontrol af testmetoden kan testes et eller flere referencestoffer, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (4). Kaliumdichromat kan ligeledes anvendes som referencestof for grønalger. Det er ønskeligt, at der testes et referencestof mindst to gange årligt.

1.7. TESTENS VALIDITET

Til afgørelse af, om en test er valid, anvendes følgende præstationskriterier:

▼M1

— Biomassen i kontrolkulturerne skal være steget eksponentielt med mindst en faktor 16 i løbet af testperioden på 72 timer. Dette svarer til en specifik vækshastighed på 0,92 $dag^{-1}$. For de oftest anvendte arter er vækshastigheden sædvanligvis betydeligt højere (se tillæg 1). Dette kriterium er ikke nødvendigvis opfyldt for arter, der er mere langsomtvoksende end de i tillæg 1 anførte. I så fald må testperioden forlænges, så der opnås en vækst til mindst det 16-dobbelte i kontrolkulturerne, og så væksten er eksponentiel i hele testperioden. For at opretholde uhæmmet eksponentiel vækst under testen kan testperioden afkortes til ikke under 48 h, når blot den minimale multiplikationsfaktor på 16 nås.

— Den gennemsnitlige variationskoefficient af den trinvise specifikke vækshastighed (ved 72-timers test, dag 0-1, 1-2 og 2-3) i kontrolkulturerne (se punkt 1.2 under »variationskoefficient«) må ikke være over 35 %. Vedrørende beregning af trinvis specifik vækshastighed: se andet afsnit i punkt 2.2.1. Kriteriet gælder for gennemsnitsværdien af variationskoefficienterne for replikate kontrolkulturer.

— Variationskoefficienten for de gennemsnitlige specifikke vækshastigheder i hele testperioden i replikate kontrolkulturer må ikke være over 7 % i test med *Pseudokirchneriella subcapitata* og *Desmodesmus subspicatus*. For andre, mindre hyppigt benyttede testede arter må værdien ikke være over 10 %.

1.8. BESKRIVELSE AF METODEN

1.8.1. **Apparatur**

Testbeholdere og andet apparatur, der kommer i berøring med testopløsningerne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Det pågældende udstyr skal være omhyggelig vasket for at sikre, at ingen organiske eller uorganiske kontaminanter kan forstyrre algevæksten eller testopløsningernes sammensætning.

Som testbeholdere anvendes sædvanligvis glaskolber af en størrelse, der giver tilstrækkeligt kulturvolumen til målingerne under testen og tilstrækkelig masseoverførsel af $CO_2$ fra atmosfæren (se andet afsnit i punkt 1.8.9). Bemærk, at der skal være tilstrækkeligt væskevolumen til de analytiske bestemmelser (se femte afsnit i punkt 1.8.11).

Derudover er der brug for følgende udstyr eller en del deraf:

— dyrkningsapparatur: Det anbefales at benytte et kabinet eller kammer med mulighed for fastholdelse af den valgte inkubationstemperatur inden for ± 2 °C.

— instrumenter til lysmåling: Man må være opmærksom på, at den anvendte metode til lysintensitetsmåling, specielt den anvendte type detektor (kollektor), vil påvirke måleværdien. Til målingerne skal fortrinsvis benyttes en sfærisk detektor (4 π-detektor) (som reagerer på direkte og reflekteret lys fra alle vinkler over og under måleplanet) eller en 2 π-detektor (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet).

▼M1

— apparatur til bestemmelse af algebiomasse: Celletal, der er den oftest anvendte surrogatparameter for algebiomasse, kan bestemmes med en elektronisk partikeltæller, et mikroskop med tællekammer eller et flowcytometer. Andre biomassesurrogater kan måles med flowcytometer, fluorimeter, spektrofotometer eller kolorimeter. Det er hensigtsmæssigt at beregne en omregningsfaktor fra celletal til tør vægt. Ved spektrofotometrisk bestemmelse af lave biomassekoncentrationer kan det være nødvendigt at bruge kuvetter med en lysvej på mindst 4 cm for at få brugbare målinger.

1.8.2. **Testorganismer**

Der kan anvendes forskellige arter af ikke-fastsiddende mikroalger og cyanobakterier. De i tillæg 1 opførte stammer har vist sig velegnede ved brug af fremgangsmåden i denne testmetode.

Benyttes andre arter, skal stamme og/eller oprindelse angives. Det skal være godtgjort, at der kan opretholdes eksponentiel vækst af de valgte testalger i hele testperioden under de givne betingelser.

1.8.3. **Næringssubstrat**

To alternative næringssubstrater, OECD-substratet og AAP-substratet, anbefales. Substraternes sammensætning er angivet i tillæg 2. Bemærk, at de to mediers initiale pH-værdi og bufferkapacitet (som regulerer pH-stigningen) er forskellige. Testningen kan derfor give forskelligt resultat afhængigt af substratet, specielt ved test af ioniserende stoffer.

Til visse formål kan det være nødvendigt at modificere substratet, f.eks. ved testning af metaller og chelaterende midler, eller når testning finder sted ved afvigende pH-værdier. Modificerede substrater skal beskrives i detaljer og deres anvendelse begrundes (3) (4).

1.8.4. **Initial biomassekoncentration**

Den initiale biomasse i testkulturerne skal være ens i alle testkulturer og tilstrækkelig lav til at muliggøre eksponentiel vækst i hele inkubationsperioden uden risiko for, at næringsstoffer opbruges. Den initiale biomasse må ikke udgøre mere end 0,5 mg/l som tør vægt. Følgende initiale cellekoncentrationer anbefales:

| | | |
|---|---|---|
| *Pseudokirchneriella subcapitata* | $5 \times 10^3$-$10^4$ | celler/ml |
| *Desmodesmus subspicatus* | 2-5 $\times 10^3$ | celler/ml |
| *Navicula pelliculosa* | $10^4$ | celler/ml |
| *Anabaena flos-aquae* | $10^4$ | celler/ml |
| *Synechococcus leopoliensis* | $5 \times 10^4$-$10^5$ | celler/ml |

1.8.5. **Teststofkoncentrationer**

Der kan udføres indledende test til at fastlægge det koncentrationsområde, hvor der kan forventes effekt. Til den endelige test skal vælges mindst fem koncentrationer, der er ordnet i en geometrisk serie med en faktor på højst 3,2. For teststoffer med flad koncentrations-responskurve kan en højere faktor være berettiget. Koncentrationsserien skal fortrinsvis dække det område, der medfører 5-75 % hæmning af algevæksthastigheden.

▼M1

1.8.6. **Replikater og kontroller**

Testens design skal indeholde tre replikater ved hver testkoncentration. Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der anvendes flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal være mindst tre replikater af kontrolprøverne, og ideelt dobbelt så mange som antallet af replikater for hver testkoncentration.

Der kan fremstilles et separat sæt testopløsninger til analytisk bestemmelse af teststofkoncentrationerne (se fjerde og sjette afsnit i punkt 1.8.11).

Anvendes et opløsningsmiddel til at bringe teststoffet i opløsning, skal testen omfatte ekstra kontroller indeholdende opløsningsmidlet i samme koncentration som i testkulturerne.

1.8.7. **Fremstilling af podekultur**

For at lade de testede alger tilpasse sig til testbetingelserne og sikre, at algerne er i den eksponentielle vækstfase, når de benyttes til podning af testopløsningerne, fremstilles en podekultur i testsubstratet 2-4 dage, før testen begynder. Mængden af algebiomasse skal tilpasses, så der bliver eksponentiel vækst i podekulturen, indtil testen begynder. Podekulturen skal inkuberes under samme betingelser som testkulturerne. Stigningen i biomasse i podekulturen skal måles for at sikre, at væksten er inden for normalområdet for den pågældende teststamme under dyrkningsbetingelserne. Et eksempel på fremgangsmåden ved dyrkning af alger er beskrevet i tillæg 3. For at undgå synkrone celledelinger under testen kan et ekstra formeringstrin af podekulturen være nødvendigt.

1.8.8. **Fremstilling af testopløsninger**

Alle testopløsninger skal indeholde samme koncentration af næringssubstrat og initial biomasse af testalger. Testopløsningerne af de valgte koncentrationer fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af teststoffet opblandes med vækstmedium og podekultur. Stamopløsningerne fremstilles normalt ved opløsning af teststoffet i testsubstrat.

Opløsningsmidler, f.eks. acetone, t-butylalkohol og dimethylformamid, kan bruges som bæremedier, når tungtopløselige stoffer skal tilsættes testsubstratet (2) (3). Opløsningsmidlets koncentration må ikke være over 100 µl/l, og det skal tilsættes i samme koncentration til alle kulturer (også kontrollerne) i testserien.

1.8.9. **Inkubation**

Testbeholderne lukkes med luftgennemtrængelige propper. Testbeholderne omrystes og anbringes i dyrkningsapparatet. Under testen skal algerne holdes opslæmmet og $CO_2$-overførslen lettes. Kontinuerlig omrystning eller omrøring er derfor nødvendig. Kulturerne skal være reguleret til en temperatur i området 21 til 24 °C, og den fastsatte temperatur skal holdes inden for ± 2 °C. Til andre arter end de i tillæg 1 anførte, f.eks. tropiske arter, kan højere temperaturer være hensigtsmæssigt, forudsat at validitetskriterierne kan opfyldes. Det anbefales at placere kolberne i tilfældig orden og dagligt bytte rundt på dem i inkubatoren.

▼M1

pH af kontrolsubstratet må højst stige med 1,5 enheder under testen. For metaller og forbindelser, der kun er delvis ioniseret ved pH-værdier omkring testens pH, kan det være nødvendigt at begrænse pH-afvigelsen for at få reproducerbare og veldefinerede resultater. Begrænsning af afvigelsen til < 0,5 pH-enhed er teknisk mulig og kan opnås ved at sikre tilstrækkelig $CO_2$-masseoverførsel fra den omgivende luft til testopløsningen, f.eks. ved at øge omrystningshastigheden. En anden mulighed er at nedsætte $CO_2$-behovet ved enten at reducere den initiale biomasse eller testens varighed.

Den overflade, som kulturerne inkuberes på, skal have kontinuerlig, ensartet fluorescerende belysning, f.eks. af typen »cool-white« eller »daylight«. Forskellige stammer af alger og cyanobakterier har forskelligt lysbehov. Der skal vælges en passende lysintensitet i forhold til den anvendte organisme. Til de anbefalede arter af grønalger skal lysintensiteten i testopløsningernes niveau vælges i området 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, målt i det fotosyntetisk effektive bølgelængdeområde 400-700 nm med en egnet detektor. Visse arter, navnlig *Anabaena flos-aquae*, vokser godt ved lavere lysintensitet og kan tage skade af højere intensitet. Til sådanne arter bør vælges en gennemsnitlig lysintensitet i området 40-60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (For lysmåleinstrumenter kalibreret i lux vil den anbefalede lysintensitet på 60-120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ med cool-white-lys tilnærmelsesvis svare til området 4 440-8 880 lux.) Lysintensiteten må ikke afvige mere end ± 15 % fra den gennemsnitlige lysintensitet i hele inkubationsområdet.

1.8.10. **Testens varighed**

Testens varighed er normalt 72 timer. Kortere eller længere varighed kan dog anvendes, forudsat at alle validitetskriterierne i punkt 1.7 kan opfyldes.

1.8.11. **Målinger og analytiske bestemmelser**

Algebiomassen i hver kolbe bestemmes mindst én gang dagligt i hele testperioden. Hvis målingerne foretages på små volumener, der er udtaget af testopløsningen med pipette, bør disse ikke erstattes.

Måling af biomasse foretages enten ved manuel celletælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller (i celletal og/eller biovolumen). Andre teknikker kan anvendes, f.eks. flowcytometri, in vitro eller in vivo chlorophyl-fluorescens (6) (7) eller optisk densitet, forudsat at der kan påvises tilfredsstillende korrelation med biomasse i hele det biomasseområde, der forekommer under testen.

Opløsningernes pH skal måles ved testens start og slutning.

Hvis der foreligger en analysemetode til bestemmelse af teststoffet i det anvendte koncentrationsområde, skal testopløsningerne analyseres til efterprøvning af intialkoncentrationerne og af, at eksponeringskoncentrationerne overholdes under testen.

▼M1

Hvis eksponeringskoncentrationerne under testen forventes at afvige mindre end 20 % fra de nominelle værdier, kan det være tilstrækkeligt at bestemme en høj og en lav teststofkoncentration og en koncentration omkring den forventede $EC_{50}$ ved testens begyndelse og slutning. Når koncentrationen ikke kan forventes at holde sig inden for 80-120 % af den nominelle værdi, anbefales analytisk bestemmelse af alle testkoncentrationer ved testens begyndelse og slutning. Til flygtige, ustabile eller stærkt adsorberende stoffer anbefales det at udtage supplerende prøver til analyse med 24 timers mellemrum i hele eksponeringsperioden for bedre at bestemme tabet af teststof. For sådanne stoffer vil ekstra replikater være nødvendige. I alle tilfælde behøver teststofkoncentrationen kun bestemmes på én replikat testbeholder ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).

Testmedier, der er fremstillet specielt til analyse af eksponeringskoncentrationerne under testen, skal behandles på samme måde som dem, der anvendes til testning, dvs. podes med alger og inkuberes ved identiske betingelser. Hvis koncentrationen af opløst teststof kræves analyseret, kan det være nødvendigt at separere algerne fra substratet. Separationen skal fortrinsvis ske ved centrifugering med lav g-kraft, tilstrækkelig til at få algerne til at bundfælde.

Hvis det kan konstateres, at prøvestofkoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte initialkoncentration større end ± 20 %, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i teststofkoncentrationen (3) (8).

Algevæksthæmning er et mere dynamisk testsystem end de fleste andre korttidstest for akvatisk toksicitet. De faktiske eksponeringskoncentrationer kan derfor være vanskelige at fastlægge, navnlig for adsorberende stoffer, der testes ved lav koncentration. I sådanne tilfælde er stoffets forsvinden fra opløsningen ved adsorption til den voksende algebiomasse ikke ensbetydende med, at det forsvinder fra testsystemet. Ved analysen af testresultatet skal det kontrolleres, om et fald i teststofkoncentrationen under testen ledsages af et fald i væksthæmningen. Hvis det er tilfældet, kan det overvejes at benytte en egnet model, der beskriver faldet i teststofkoncentrationen (8). Hvis ikke, kan det være hensigtsmæssigt at basere analysen af resultaterne på de initiale (nominelle eller målte) koncentrationer.

1.8.12. **Andre observationer**

Der skal foretages mikroskopisk undersøgelse for at verificere, at podekulturen fremtræder normal og sund, og konstatere, om algernes udseende er unormalt ved testens slutning (som en mulig følge af eksponeringen for teststoffet).

▼M1

1.8.13. **Grænsetest**

Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at teststoffet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 $mg \cdot l^{-1}$, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i én behandlingsgruppe (100 $mg \cdot l^{-1}$ eller en koncentration lig med opløseligheden). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier gælder for grænsetesten, bortset fra, at antallet af behandlingsreplikater skal være mindst seks. Responsvariablerne i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test. Er variansen i de to grupper uens, skal der anvendes en t-test justeret for forskel i varians.

1.8.14. **Modifikation i tilfælde af stærkt farvede stoffer**

Belysningen (lysintensiteten) skal ligge i den højeste ende af det interval, der forskrives i testmetoden, dvs. 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ eller højere.

Lysvejen forkortes ved at reducere testopløsningernes volumen (til intervallet 5-25 ml).

Der sørges for tilstrækkelig omrøring (f.eks. ved moderat rystning), for at algerne kan blive udsat for stærk belysning ved kulturoverfladen.

2. **DATA**

2.1. OPTEGNING AF VÆKSTKURVER

Biomassen i testbeholderne kan angives i enheder svarende til den til målingen anvendte surrogatparameter (f.eks. celletal eller fluorescens).

Der opstilles en tabel over den beregnede biomassekoncentration i testkulturer og kontroller sammen med teststofkoncentrationer og måletidspunkter, målt med en mindste opløsning på hele timer, og derudfra optegnes vækstkurverne. Både logaritmisk og lineær afbildning kan være nyttig på dette første trin, men logaritmisk afbildning er obligatorisk og giver sædvanligvis en bedre fremstilling af variationerne i vækstmønsteret i løbet af testperioden. Bemærk, at eksponentiel vækst frembringer en ret linje, når den afbildes på en logaritmisk skala, og at linjens hældning angiver den specifikke væksthastighed.

Ud fra kurverne undersøges det, om kontrolkulturerne vokser eksponentielt med den forventede hastighed igennem hele testen. Alle datapunkter og kurvernes udseende kontrolleres kritisk, og rådata og de anvendte metoder gås efter for eventuelle fejl. Navnlig kontrolleres alle datapunkter, der synes at afvige med en systematisk fejl. Det er indlysende, at hvis metodefejl kan konstateres og/eller må anses for stærkt sandsynlige, må det pågældende punkt markeres som afvigende og udelades af den efterfølgende statistiske analyse. (En algekoncentration på nul i den ene af tre replikate testbeholdere kan tyde på, at beholderen enten ikke er blevet podet korrekt eller ikke har været tilstrækkelig rengjort.) Begrundelsen for at afvise et datapunkt som afvigende skal klart angives i testrapporten. Som begrundelse godtages kun (sjældne) metodefejl, ikke blot ringe præcision. Til identifikation af afvigende værdier har statistiske metoder kun begrænset værdi ved problemer af denne art og kan ikke erstatte en faglig vurdering. Afvigende værdier (mærket som sådanne) skal helst bibeholdes blandt de datapunkter, der vises ved efterfølgende fremstilling af data i grafer eller tabeller.

▼M1

2.2. RESPONSVARIABLER

Testens formål er at bestemme teststoffets virkninger på væksten af alger. I nærværende testmetode beskrives to responsvariabler, da medlemsstaterne har forskellige præferencer og myndighedskrav. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle medlemsstater, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariabler a) og b).

a) gennemsnitlig specifik vækshastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske stigning i biomasse i løbet af testperioden, angivet pr. døgn.

b) udbytte: Denne responsvariabel er biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start.

Når denne metode anvendes i forbindelse med EU-lovgivningen, skal resultaterne beregnes på grundlag af den gennemsnitlige specifikke vækshastighed, af de grunde, der er anført nedenfor. Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariabler ikke er sammenlignelige, og denne forskel må haves for øje ved anvendelse af testens resultater. $EC_x$-værdier baseret på gennemsnitlig specifik vækshastighed ($E_rC_x$) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte ($E_yC_x$), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariabler, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik vækshastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for alger i ikke-begrænsede kulturer, mens toksicitet vurderes på grundlag af virkningerne på vækshastigheden og ikke afhænger af den absolutte størrelse af den specifikke vækshastighed af kontrollen, koncentrations-responskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariablen udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variabler. $E_yC_x$ afhænger af den specifikke vækshastighed af de algearter, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke vækshastighed, som kan variere mellem de forskellige arter og endda algestammer. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer hos forskellige algearter eller -stammer. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke vækshastighed, indeholder nærværende testmetode toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse stater.

2.2.1. **Gennemsnitlig specifik vækshastighed**

Den gennemsnitlige specifikke vækshastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i biomasse ved hjælp af ligningen for hver enkelt testbeholder med kontrol- og behandlingsprøver:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}, \ (\text{dag}^{-1})$$

hvor:

$\mu_{i-j}$: er den gennemsnitlige specifikke vækshastighed fra tiden *i* til *j*

$X_i$: er biomassen til tiden *i*

$X_j$: er biomassen til tiden *j*.

▼M1

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimater for variansen.

Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i hele testperioden (sædvanligvis dag 0-3) beregnes ved at bruge den nominelt podede biomasse som startværdi i stedet for en målt startværdi, da der herved sædvanligvis opnås størst præcision. Hvis udstyret til biomassemåling tillader tilstrækkelig nøjagtig bestemmelse af den lille mængde podet biomasse (f.eks. med flowcytometer), kan den målte initiale biomassekoncentration anvendes. Desuden foretages trinvis beregning af den specifikke væksthastighed for hver dag af testen (dag 0-1, 1-2 og 2-3), og det undersøges, om væksthastigheden i kontrollen forbliver konstant (se validitetskriterierne i punkt 1.7). Er den specifikke væksthastighed væsentligt lavere på dag ét end den totale gennemsnitlige specifikke væksthastighed, kan dette tyde på, at der er tale om en lag-fase. Mens en lag-fase i kontrolkulturerne kan minimeres og i praksis elimineres ved korrekt formering af forkulturen, kan en lag-fase i eksponerede kulturer tyde på, at der er tale om restitution efter indledende toksisk stress, eller at eksponeringen efter den initiale eksponering er mindsket pga. tab af teststof (herunder sorption på algebiomassen). Trinvis beregning af væksthastigheden kan derfor anvendes til at vurdere teststoffets virkninger i eksponeringsperioden. Væsentlige forskelle mellem den trinvist beregnede væksthastighed og den gennemsnitlige væksthastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig.

Den procentuelle hæmning af væksthastigheden beregnes for hver behandlingsreplikat af udtrykket:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

hvor:

$\%I_r$: procent hæmning af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

$\mu_C$: middelværdi af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed ($\mu$) i kontrolgruppen

$\mu_T$: gennemsnitlig specifik væksthastighed for behandlingsreplikaten.

Når der anvendes opløsningsmiddel til fremstilling af testopløsningerne, skal hæmningen i procent beregnes ved hjælp af opløsningsmiddelkontroller i stedet for kontroller uden opløsningsmiddel.

2.2.2. **Udbytte**

Udbyttet beregnes som biomassen ved testens slutning minus biomassen ved testens start for hver enkelt beholder med kontrol- eller behandlingsprøve. For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent ($\%I_y$) kan beregnes for hver behandlingsreplikat som følger:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼**M1**

hvor:

% $I_y$: udbyttehæmning i procent

$Y_C$: gennemsnitligt udbytte i kontrolgruppen

$Y_T$: størrelsen af udbyttet for behandlingsreplikaten.

2.3. OPTEGNING AF KONCENTRATIONS-RESPONSKURVE

Hæmningen i procent afsættes som funktion af logaritmen til test-stofkoncentrationen, og grafen undersøges nøje, idet der ses bort fra alle datapunkter, der er udpeget som afvigende i første fase. Der lægges en jævn linje gennem datapunkterne, enten på fri hånd eller med computer-interpolation, for at få et første indtryk af koncentrations-responssammenhængen, hvorefter der fortsættes med en mere dybtgående metode, helst en computerbaseret statistisk metode. Afhængigt af den påtænkte anvendelse af data, dataenes kvalitet (præcision) og mængde samt adgangen til værktøjer til data-analyse kan det blive besluttet (undertiden med god grund) at standse dataanalysen på dette trin og blot aflæse nøgletallene $EC_{50}$ og $EC_{10}$ (og/eller $EC_{20}$) på frihåndskurven (se også afsnittet nedenfor om stimulerende virkninger). Af gyldige grunde til ikke at benytte en statistisk metode kan nævnes:

— Data er ikke egnede til at give mere pålidelige resultater ved hjælp af computermetoder end ved et fagligt skøn — nogle computerprogrammer kan i sådanne situationer endda være ude af stand til at finde en pålidelig løsning (f.eks. hvis iterationen ikke konvergerer).

— Stimuleret vækstrespons kan ikke behandles fyldestgørende med de forhåndenværende computerprogrammer (se nedenfor).

2.4. STATISTISKE METODER

Målet er at formulere en kvantitativ koncentrations-responssammen-hæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (9), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret af transformationen og derved forstyrre analysen (9). Det må bemær-kes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variabler, er bestemt til brug på quantale data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne håndtere vækst- eller biomassedata. Særlige metoder til bestemmelse af $EC_x$-værdier ud fra kontinuerte data findes i henvisning (10) (11) (12). Brugen af ikke-lineær regressionsanalyse er nærmere beskrevet i tillæg 4.

▼M1

For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations-responsrelationen til at beregne punktestimater for $EC_x$-værdier. Når det er muligt, skal der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages ud fra responsværdierne for de enkelte replikater, ikke gruppegennemsnit. Hvis ikke-lineær kurvetilpasning er vanskelig eller umulig på grund af for stor spredning i data, kan problemet omgås ved udførelse af regressionen på gruppegennemsnittet som en praktisk måde at mindske indflydelsen fra formodet afvigende værdier på. Når denne mulighed udnyttes, skal det i testrapporten anføres, at der her er afveget fra den normale procedure, fordi kurvetilpasning med de enkelte replikater ikke har givet et godt resultat.

Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for $EC_{50}$ desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (13).

For at beregne et estimat for LOEC og dermed NOEC og for teststoffets virkninger på vækshastigheden må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan eventuelt bruges (14) (15) (16) (17) (18). Det skal vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (18). Hertil kan Levenes eller Bartletts test anvendes Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Der er supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC i (12).

Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater for $EC_x$. Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne algetest. Et område på 10 til 20 % synes at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både $EC_{10}$ og $EC_{20}$.

2.5. VÆKSTSTIMULATION

Ved lave koncentrationer ses undertiden vækststimulation (negativ hæmning). Dette kan enten skyldes hormese (»toksisk stimulation«), eller at der er tilsat vækststimulerende faktorer sammen med testmaterialet til det anvendte minimalsubstrat. Bemærk, at tilsætning af uorganiske næringsstoffer ikke skulle have nogen direkte virkning, da testsubstratet skal indeholde overskud af næringsstoffer under hele testen. Sædvanligvis kan der ses bort fra lavdosisstimulation i $EC_{50}$-beregninger, medmindre den er ekstrem. Er den ekstrem, eller skal der beregnes en $EC_x$-værdi for en lav x-værdi, kan særlige procedurer dog være nødvendige. Om muligt bør det undgås at lade stimulerende responsværdier udgå af dataanalysen, og kan den forhåndenværende kurvetilpasningssoftware ikke acceptere en lav grad af stimulation, kan der anvendes lineær interpolation med bootstrapping. Hvis stimulationen er ekstrem, kan det overvejes at anvende en hormese-model (19).

▼M1

2.6. IKKE-TOKSISK VÆKSTHÆMNING

Lysabsorberende teststoffer kan nedsætte væksthastigheden, fordi de ved at skygge mindsker den tilgængelige lysmængde. Sådanne fysiske virkninger må adskilles fra toksiske virkninger ved ændring af testbetingelserne og skal rapporteres særskilt. Vejledning findes i (2) (3).

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende:

Teststof:

— fysisk tilstand og relevante fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed

— kemiske identifikationsdata, herunder renhed.

Testede arter:

— stamme, leverandør eller kilde og anvendte dyrkningsbetingelser.

Testbetingelser:

— startdato og varighed for testen

— beskrivelse af testens design: testbeholdere, kulturvolumen, biomassetæthed ved testens start

— substratets sammensætning

— testkoncentrationer og replikater (f.eks. antal replikater, antal testkoncentrationer og den anvendte geometriske progression)

— beskrivelse af fremstillingen af testopløsningerne, herunder brug af opløsningsmiddel osv.

— dyrkningsapparatur

— lysintensitet og -kvalitet (kilde, homogenitet)

— temperatur

— testede koncentrationer: de nominelle testkoncentrationer og alle resultater af bestemmelser af teststofkoncentrationen i testbeholderne. Metodens genfindingsgrad og kvantificeringsgrænse i testmatrixen skal rapporteres

— alle fravigelser af nærværende testmetode

— metode til bestemmelse af biomasse og påvisning af korrelation mellem den målte parameter og den tørre vægt.

Resultater:

— pH-værdi ved testens start og slutning for alle behandlinger

— biomasse for hver kolbe ved hvert målepunkt samt metode til måling af biomasse

▼**M1**

— vækstkurver (biomasse som funktion af tiden)

— beregnede responsvariabler for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne

— grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning

— estimater for toksiciteten for responsvariablerne, f.eks. $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$ med tilhørende konfidensintervaller. LOEC og NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at bestemme dem

— hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)

— enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling

— eventuelle andre observerede effekter, f.eks. morfologiske ændringer af algerne

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra nærværende testmetode.

4. **LITTERATUR**

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

(2) ISO 1998 Water quality — Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality — Sampling — Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667-16.

(5) ISO 1993: Water quality — Algal growth inhibition test. ISO 8692.

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525-2531.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp.919-925.

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073-2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11:1485-1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

*Tillæg 1*

**Stammer, der er påvist at være velegnede til testen**

**Grønalger**

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (tidligere benævnt *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (tidligere benævnt *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

**Diatoméer**

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

**Cyanobakterier**

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

**Kilder til stammer**

De anbefalede stammer fås som monokulturer fra følgende samlinger (i alfabetisk rækkefølge):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
UNITED KINGDOM

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nicholausberger Weg 18
3400 Göttingen
TYSKLAND

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼M1

**Udseende og karakteristika af anbefalede arter**

| | *P. subcapitata* | *D. subspicatus* | *N. pelliculosa* | *A. flos-aquae* | *S. leopoliensis* |
|---|---|---|---|---|---|
| Udseende | Krumme, skrueformede enkeltceller | Ovale, hovedsagelig enkeltceller | Stave | Kæder af ovale celler | Stave |
| Størrelse (L × W), µm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Cellevolumen ($\mu m^3$/celle) | 40-60 (1) | 60-80 (1) | 40-50 (1) | 30-40 (1) | 2,5 (2) |
| Tør vægt af celle (mg/celle) | 2-3 × $10^{-8}$ | 3-4 × $10^{-8}$ | 3-4 × $10^{-8}$ | 1-2 × $10^{-8}$ | 2-3 × $10^{-9}$ |
| Væksthastighed (3) ($dag^{-1}$) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0-2,4 |

(1) Målt med elektronisk partikeltæller.
(2) Beregnet af størrelsen.
(3) Hyppigste observerede væksthastighed i OECD-substrat ved en lysintensitet på ca. 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ og 21 °C.

**Særlige anbefalinger for dyrkning og håndtering af de anbefalede testarter**

*Pseudokirchneriella subcapitata og Desmodesmus subspicatus*

Disse grønalgearter er sædvanligvis lette at holde i forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Cellerne er normalt solitære, og måling af celletætheden kan let foretages med elektronisk partikeltæller eller i mikroskop.

*Anabaena flos-aquae*

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Det er især vigtigt at undgå, at batchkulturen kommer ud af den logaritmiske vækstfase, når den fornyes, da restitution på dette punkt er vanskelig.

*Anabaena flos-aquae* udvikler aggregater af sammenfiltrede kæder af celler. Størrelsen af aggregaterne kan være forskellig, afhængigt af dyrkningsbetingelserne. Det kan være nødvendigt at bryde sådanne aggregater op, før biomassen kan bestemmes ved tælling i mikroskop eller med en elektronisk partikeltæller.

For at nedsætte variabiliteten af tællingerne kan kæderne brydes op ved sonikering af delprøver. Hvis sonikeringen fortsættes længere end nødvendigt for at bryde kæderne til kortere længder, kan cellerne blive ødelagt. Intensitet og varighed af sonikeringen skal være ens for alle behandlinger.

For at medvirke til at kompensere for variabiliteten skal der tælles et tilstrækkeligt antal felter på hæmocytometeret (mindst 400 celler). Derved fås mere pålidelige tæthedsbestemmelser i mikroskop.

Til bestemmelse af det totale cellevolumen af Anabaena kan en elektronisk partikeltæller anvendes efter forudgående forsigtig sonikering for at bryde cellekæderne. Sonikeringsenergien skal tilpasses, så bristning af celler undgås.

Ved hjælp af hvirvelomrører eller en tilsvarende velegnet metode skal det sikres, at den anvendte algesuspension til podning af testbeholderne er godt opblandet og homogen.

▼**M1**

Testbeholderne anbringes på et roterende eller frem- og tilbagegående rystebord ved ca. 150 o./min. I stedet kan der anvendes intermitterende omrystning for at mindske Anabaenas tilbøjelighed til sammenklumpning. I tilfælde af sammenklumpning skal der drages omsorg for, at prøverne til biomassebestemmelse bliver repræsentative. Energisk omrystning kan være nødvendig før prøvetagning for at skille algeklumperne ad.

*Synechococcus leopoliensis*

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne.

*Synechococcus leopoliensis* vokser som solitære, stavformede celler. Cellerne er meget små, hvilket komplicerer tælling i mikroskop til biomassebestemmelse. Elektroniske partikeltællere, der er udstyret til tælling af partikler ned til ca. 1 μm, er gode. In vitro fluorometrisk måling kan ligeledes anvendes.

*Navicula pelliculosa*

Stamkulturer kan holdes med forskellige næringssubstrater. Oplysninger om egnede substrater kan fås fra kultursamlingerne. Bemærk, at substratet skal indeholde silikat.

*Navicula pelliculosa* kan danne aggregater under visse vækstbetingelser. På grund af dannelse af lipider vil algecellerne undertiden have tendens til at akkumulere i overfladefilmen. Under sådanne omstændigheder må der ved udtagning af delprøver til biomassebestemmelse træffes særlige foranstaltninger for at sikre, at prøverne er repræsentative. Det kan være nødvendigt med kraftig omrystning, f.eks. med en hvirvelomrører.

▼**M1**

*Tillæg 2*

**Næringssubstrater**

Et af nedenstående to næringssubstrater kan anvendes:

OECD-substrat: Det oprindelige substrat fra OECD TG 201, også i henhold til ISO 8692

US. EPA-substrat AAP, ligeledes i henhold til ASTM.

Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

**Sammensætning af AAP-substratet (US. EPA) og OECD TG 201-substratet**

| Komponent | EPA | | OECD | |
|---|---|---|---|---|
| | mg/l | mM | mg/l | mM |
| $NaHCO_3$ | 15,0 | 0,179 | 50,0 | 0,595 |
| $NaNO_3$ | 25,5 | 0,300 | | |
| $NH_4Cl$ | | | 15,0 | 0,280 |
| $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 12,16 | 0,0598 | 12,0 | 0,0590 |
| $CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$ | 4,41 | 0,0300 | 18,0 | 0,122 |
| $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$ | 14,6 | 0,0592 | 15,0 | 0,0609 |
| $K_2HPO_4$ | 1,044 | 0,00599 | | |
| $KH_2PO_4$ | | | 1,60 | 0,00919 |
| $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ | 0,160 | 0,000591 | 0,0640 | 0,000237 |
| $Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$ | 0,300 | 0,000806 | 0,100 | 0,000269 (*) |
| $H_3BO_3$ | 0,186 | 0,00300 | 0,185 | 0,00299 |
| $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ | 0,415 | 0,00201 | 0,415 | 0,00210 |
| $ZnCl_2$ | 0,00327 | 0,000024 | 0,00300 | 0,0000220 |
| $CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 0,00143 | 0,000006 | 0,00150 | 0,00000630 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$ | 0,00726 | 0,000030 | 0,00700 | 0,0000289 |
| $CuCl_2.2(H_2O)$ | 0,000012 | 0,00000007 | 0,00001 | 0,00000006 |
| pH | 7,5 | | 8,1 | |

(*) Det molære forhold mellem EDTA og jern er lidt over 1. Derved undgås udfældning af jern, samtidig med at chelatering af tungmetalioner minimeres.

I testen med diatoméen *Navicula pelliculosa* skal begge substrater suppleres med $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ til en koncentration på 1,4 mg Si/l.

Substratets pH opnås ved ligevægt mellem substratets carbonatsystem og partialtrykket af $CO_2$ i atmosfærisk luft. En omtrentlig sammenhæng mellem pH ved 25 °C og den molære bicarbonatkoncentration er givet ved:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

Ved 15 mg $NaHCO_3$/l er $pH_{eq}$ = 7,5 (U.S. EPA-substrat), og ved 50 mg $NaHCO_3$/l er $pH_{eq}$ = 8,1 (OECD-substrat).

**Testsubstraternes sammmensætning af grundstoffer**

| Grundstof | EPA | OECD |
|---|---|---|
| | mg/l | mg/l |
| C | 2,144 | 7,148 |
| N | 4,202 | 3,927 |
| P | 0,186 | 0,285 |
| K | 0,469 | 0,459 |
| Na | 11,044 | 13,704 |
| Ca | 1,202 | 4,905 |
| Mg | 2,909 | 2,913 |
| Fe | 0,033 | 0,017 |
| Mn | 0,115 | 0,115 |

**Fremstilling af OECD-substrat**

| Næringsstof | Koncentration i stamopløsning |
|---|---|
| Stamopløsning 1: makronæringsstoffer | |
| $NH_4Cl$ | 1,5 $g \cdot l^{-1}$ |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,2 $g \cdot l^{-1}$ |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 1,8 $g \cdot l^{-1}$ |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,5 $g \cdot l^{-1}$ |
| $KH_2PO_4$ | 0,16 $g \cdot l^{-1}$ |
| Stamopløsning 2: jern | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 64 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 100 $mg \cdot l^{-1}$ |
| Stamopløsning 3: sporstoffer | |
| $H_3BO_3$ | 185 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 415 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $ZnCl_2$ | 3 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,5 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,01 $mg \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7 $mg \cdot l^{-1}$ |
| Stamopløsning 4: bicarbonat | |
| $NaHCO_3$ | 50 $g \cdot l^{-1}$ |
| $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ | |

Stamopløsningen steriliseres ved membranfiltrering (middelporediameter 0,2 μm) eller autoklavering (120 °C, 15 min.). Opløsningerne opbevares i mørke ved 4 °C.

Stamopløsning 2 og 4 må ikke autoklaveres, men skal steriliseres ved membranfiltrering.

▼M1

Næringssubstrater fremstilles ved tilsætning af et passende volumen stamopløsning 1-4 til vand:

Til 500 ml steriliseret vand tilsættes der:

— 10 ml stamopløsning 1

— 1 ml stamopløsning 2

— 1 ml stamopløsning 3

— 1 ml stamopløsning 4.

Der tilsættes steriliseret vand til 1 000 ml.

Giv substratet tid til at ækvilibrere med atmosfærens $CO_2$, om nødvendigt ved nogle timers gennembobling med sterilfiltreret luft.

**Fremstilling af AAP-substrat**

A1.1. 1 ml af hver stamopløsning i A1.2.1-A1.2.7 tilsættes til ca. 900 ml deioniseret eller destilleret vand og fortyndes derefter til 1 liter.

A1.2. Stamopløsninger af makronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand. Reagens A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 og A1.2.4 kan kombineres til én stamopløsning.

A1.2.1. $NaNO_3$ -12,750 g

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ -6,082 g

A1.2.3. $MgCl_2 \cdot 2H_2O$ -2,205 g

A1.2.4. Stamopløsning af mikronæringsstoffer — (se A1.3)

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -7,350 g

A1.2.6. $K_2HPO_4$ -0,522 g

A1.2.7. $NaHCO_3$ -7,500 g

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ — se bemærkning A1.1.

BEMÆRKNING A1.1: Anvendes kun til diatomé-testarter. Kan tilsættes direkte (202,4 mg) eller som stamopløsning til en endelige Si-koncentration i substratet på 20 mg/l.

A1.3. Stamopløsningen af mikronæringsstoffer fremstilles ved opløsning af nedenstående i 500 ml deioniseret eller destilleret vand:

A1.3.1. $H_3BO_3$ -92,760 mg

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ -207,690 mg

A1.3.3. $ZnCl_2$ -1,635 mg

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -79,880 mg

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ -0,714 mg

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ -3,630 mg

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ -0,006 mg

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ -150,000 mg [dinatrium-(ethylendinitrilo-)tetraacetat]

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ -0,005 mg, se bemærkning A1.2.

BEMÆRKNING A1.2: Bruges kun i substrat til stamkulturer af diatoméarter.

A1.4. pH justeres til 7,5 ± 0,1 med 0,1 *N* eller 1,0 *N* NaOH eller HCl.

A1.5. Substratet filtreres over i en steril beholder, enten gennem et 0,22 µm membranfilter, hvis der skal bruges partikeltæller, eller et 0,45 µm filter, hvis der ikke skal bruges partikeltæller.

A1.6. Substratet opbevares i mørke ved ca. 4 °C, til det skal bruges.

▼M1

*Tillæg 3*

**Eksempel på fremgangsmåde ved dyrkning af alger**

**Almindelige bemærkninger**

Formålet med dyrkningen efter følgende metode er at fremstille algekulturer til toksicitetstest.

Det skal ved hjælp af egnede metoder sikres, at algekulturerne ikke er inficeret med bakterier. Axeniske kulturer kan være ønskeligt, men der skal fremstilles og anvendes monokulturer af alger.

Alle operationer skal udføres med steril teknik for at undgå kontaminering med bakterier og andre alger.

**Udstyr og materialer**

Se under testmetode: Apparatur.

**Metoder til fremstilling af algekulturer**

*Fremstilling af næringssubstrater (medier):*

Alle næringssalte i substratet fremstilles som koncentrerede stamopløsninger, der opbevares mørkt og koldt. Disse opløsninger steriliseres ved filtrering eller autoklavering.

Substratet fremstilles ved, at den korrekte mængde stamopløsning sættes til destilleret vand, idet der udvises omhu for at undgå kontaminering. Til faste substrater tilsættes 0,8 procent agar.

*Stamkultur:*

Stamkulturerne er små algekulturer, der regelmæssigt overføres til friskt substrat og anvendes som udgangsmateriale ved testen. Hvis kulturerne ikke jævnligt bruges, udstryges de på skråagarrør. Herfra overføres de til friskt substrat mindst hver anden måned.

Stamkulturerne dyrkes i koniske kolber indeholdende det pågældende substrat (volumen ca. 100 ml). Når algerne inkuberes ved 20 °C med kontinuerlig belysning, skal de overføres en gang om ugen.

Ved overførslen føres en del af den »gamle« kultur med sterile pipetter til en kolbe med friskt substrat, så initialkoncentrationen for hurtigtvoksende arter er ca. 100 gange mindre end i den gamle kultur.

Væksthastigheden for en art kan bestemmes af vækstkurven. Kendes denne, kan man beregne, ved hvilken tæthed kulturen skal overføres til nyt substrat. Dette skal ske, før kulturen når dødsfasen.

*Forkultur:*

Forkulturen har til formål at producere en mængde alger, der er egnede til podning af testkulturer. Forkulturen inkuberes under testbetingelserne og anvendes, mens den endnu er i eksponentiel vækst, normalt efter en inkubationsperiode på 2 til 4 dage. Når algekulturer indeholder deforme eller abnorme celler, skal de kasseres.

▼M1

*Tillæg 4*

**Dataanalyse ved ikke-lineær regression**

**Generelle betragtninger**

Responsen i algetest og andre test af mikrobiel vækst — vækst af biomasse — er i sig selv en kontinuert eller metrisk variabel — en proceshastighed, når vækst-hastigheden anvendes, og integralet af væksthastigheden med hensyn til tiden, når biomasse vælges. Begge henføres til den tilsvarende gennemsnitsrespons for replikate, ikke-eksponerede kontroller, der udviser maksimal respons ved de anvendte betingelser — med lys og temperatur som de primære bestemmende faktorer i algetesten. Systemet er distribueret eller homogent, og biomassen kan betragtes som en helhed uden hensyn til enkeltceller. Variansfordelingen for den type respons, der ses i et sådant system, afhænger udelukkende af eksperimentelle faktorer (dette beskrives typisk ved, at fejlen er log-normalfordelt eller normalfordelt). Dette er modsat typiske bioassay-responser med kvantale data, hvor det dominerende bidrag til variansen ofte antages at være de enkelte organismers tolerance (der typisk er binomialfordelt). Responsen fra kontrollerne er her nulniveau eller baggrundsniveau.

I det ukomplicerede tilfælde aftager den normaliserede eller relative respons, r, monotont fra 1 (ingen hæmning) til 0 (100 procents hæmning). Bemærk, at der til alle responser er knyttet en fejl, og at tilsyneladende negative hæmningsværdier ved beregningen kan tilskrives tilfældige fejl alene.

**Regressionsanalyse**

*Modeller*

Med regressionsanalyse tilstræbes det at beskrive koncentrations-responskurven som en matematisk regressionsfunktion $Y = f(C)$ eller oftere $F(Z)$, hvor $Z = \log C$. Med den omvendte funktion $C = f^{-1}(Y)$ kan der beregnes $EC_x$-værdier, herunder $EC_{50}$, $EC_{10}$ og $EC_{20}$, med tilhørende 95 % konfidensgrænser. Flere forskellige enkle matematiske funktioner har vist sig velegnede til at beskrive den koncentrations-responssammenhæng, der optræder i væksthæmningstest med alger. Af sådanne funktioner kan nævnes den logistiske ligning, den asymmetriske Weibull-ligning og log-normalfordelingsfunktionen, der alle er S-formede kurver, der asymptotisk går mod én for $C \rightarrow 0$, og mod nul for $C \rightarrow$ uendeligt.

Anvendelse af modeller med kontinuerte tærskelfunktioner (f.eks. »the Kooijman model for inhibition of population growth« Kooijman et al. 1996) er for nylig blevet foreslået som et alternativ til asymptotiske modeller. I denne model antages, at der ikke er nogen virkninger ved koncentrationer under en bestemt tærskel, EC0+, som estimeres ved at ekstrapolere responskoncentrationsforholdet til skæring med koncentrationsaksen ved hjælp af en simpel kontinuert funktion, der ikke er differentiabel i udgangspunktet.

Bemærk, at analysen kan bestå i en simpel minimering af summer af residual-kvadrater (når variansen forudsættes konstant) eller af vægtede kvadrater, når der kompenseres for variansheterogenitet.

▼M1

*Fremgangsmåde*

Fremgangsmåden kan sammenfattes således: Der vælges en passende funktion, Y = f (C), som tilpasses til dataene ved ikke-lineær regression. Det må foretrækkes at anvende målinger fra hver enkelt kolbe frem for gennemsnitsværdier for replikaterne, da man derved får mest mulig information fra dataene. Hvis variansen derimod er høj, tyder praktisk erfaring på, at der ved brug af gennemsnitsværdier af replikaterne fås en mere robust matematisk beregning, der er mindre påvirkelig af systematiske fejl i data end bibeholdelse af de enkelte datapunkter.

Den tilpassede kurve og de målte data afsættes, og det undersøges, om tilpasningen af kurven er tilfredsstillende. Analyse af residualer kan være et særdeles nyttigt redskab til dette formål. Hvis den valgte funktion for koncentrations-responssammenhængen ikke beskriver hele kurven eller en vigtig del af denne som f.eks. responsen i koncentrationslavpunktet, vælges en anden mulighed for kurvetilpasning — f.eks. en ikke-symmetrisk kurve som Weibul-funktionen i stedet for en symmetrisk. Negativ hæmning kan være et problem ved brug af f.eks. log-normalfordelingsfunktionen, så der også her er brug for en alternativ regressionsfunktion. Det kan ikke anbefales at tildele en nulværdi eller en lille positiv værdi til sådanne negative værdier, da det forvrænger fejlfordelingen. Det kan være hensigtsmæssigt at foretage separate kurvetilpasninger, f.eks. på den del af kurven, hvor hæmningen er lille, for at beregne et estimat for $EC_{low\ x}$-værdierne. Af den tilpassede ligning beregnes (ved »omvendt beregning«, $C = f^{-1}(Y)$) karakteristiske punktestimater $EC_x$, og som minimum rapporteres $EC_{50}$-værdien og et eller to estimater for $EC_{low\ x}$. De praktiske erfaringer fra testningerne har vist, at algetesten sædvanligvis er tilstrækkelig præcis til at give et rimelig nøjagtigt estimat ved 10 % hæmning, hvis der er tilstrækkeligt med datapunkter — medmindre der ved lave koncentrationer optræder stimulation som konfunderende faktor. Nøjagtigheden af et estimat for $EC_{20}$ er ofte betydeligt bedre end af en $EC_{10}$-værdi, da $EC_{20}$ sædvanligvis ligger på den tilnærmelsesvis lineære del af den centrale del af koncentrations-responskurven. Undertiden kan $EC_{10}$ være vanskelig at fortolke på grund af vækststimulation. Selv om $EC_{10}$ således normalt fås med tilstrækkelig nøjagtighed, anbefales det således, at man desuden altid rapporterer $EC_{20}$-værdien.

*Vægtningsfaktorer*

Den eksperimentelle varians er sædvanligvis ikke konstant, men indeholder typisk en proportional komponent, hvorfor rutinemæssig brug af vægtet regression vil være en fordel. Vægtningsfaktorerne til en sådan analyse antages normalt at være omvendt proportionale med variansen:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Mange regressionsprogrammer kan bruges til vægtet regressionsanalyse med vægtningsfaktorer angivet i en tabel. For nemheds skyld bør vægtningsfaktorerne normaliseres ved multiplikation med $n/\sum w_i$ (hvor n er antallet af datapunkter), således at deres sum bliver lig én.

*Normalisering af respons*

Normalisering med gennemsnitsresponsen i kontrollerne medfører visse principielle problemer foruden en ret kompliceret variansstruktur. Når responsværdierne divideres med kontrollernes gennemsnitsrespons for at få hæmningen i procent, indføres derved en ekstra fejl, der skyldes fejlen på middelværdien for kontrollerne. Medmindre denne fejl er ubetydelig, skal vægtningsfaktorerne i regressionen og konfidensgrænserne korrigeres for kovarians med kontrollen (17). Bemærk, at det er vigtigt med en høj præcision af estimatet for middelværdien af responsen i kontrollerne, for at den samlede varians af den relative repons kan blive minimeret. Denne varians kan angives således:

▼**M1**

(indeks i henviser til koncentrationsniveau i og indeks 0 til kontrollerne)

$$Y_i = \text{Relativ respons} = r_i/r_0 = 1 — I = f(C_i)$$

med variansen:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \approx (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

og, eftersom

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0, \text{ og } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

med normalfordelte data og replikaterne $m_i$ og $m_0$:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

bliver den totale varians af den relative respons $Y_i$:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

Fejlen på middelværdien for kontrollerne er omvendt proportional med kvadratroden af det antal replikater af kontrollerne, som gennemsnittet er beregnet af, og undertiden kan det være berettiget at medtage historiske data for på denne måde at mindske fejlen stærkt. En alternativ metode er at undlade normalisering af dataene og i stedet tilpasse de absolutte responsværdier, også responsdata for kontrollerne, men herved indføres responsværdien for kontrollerne som en ekstra parameter, der skal indgå i tilpasningen ved ikke-lineær regression. Med en sædvanlig to-parametres regressionsligning kræver denne metode tilpasning af tre parametre og dermed flere datapunkter end ikke-lineær regression på data, der er normaliseret med en forud fastlagt respons for kontrollerne.

*Omvendte konfidensintervaller*

Beregning af konfidensintervaller i ikke-lineær regression ved hjælp af omvendt estimation er ret kompliceret og hører ikke til standardvalgene i almindelige statistikprogrampakker. Tilnærmede konfidensgrænser kan beregnes med standardprogrammer til ikke-lineær regression med re-parameterisering (Bruce og Versteeg, 1992), hvorved den matematiske ligning omskrives med de ønskede punktestimater, f.eks. med $EC_{10}$ og $EC_{50}$ som de parametre, der skal estimeres. (Lad funktionen være I = f (α, β, koncentration), og benyt definitionsrelationerne f (α, β, $EC_{10}$) = 0,1 og f (α, β, $EC_{50}$) = 0,5 til at erstatte funktionen f (α, β, koncentration) med den ækvivalente funktion g ($EC_{10}$, $EC_{50}$, koncentration.)

En mere direkte beregning (Andersen et al, 1998) foretages ved at bibeholde den oprindelige ligning og bruge Taylor-udvikling omkring middelværdierne af $r_i$ og $r_0$.

På det seneste har »boot strap«-metoder vundet udbredelse. I sådanne metoder estimeres en empirisk variansfordeling ved hjælp af de målte data sammen med hyppig resampling, der styres af en generator af tilfældige tal.

**Referencer**

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625-1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405-420.

▼B

C.4. **BESTEMMELSE AF »LET« BIONEDBRYDELIGHED**

DEL I. **GENERELLE BETRAGTNINGER**

I.1. INDLEDNING

Der er beskrevet seks metoder til screening af kemikalier for let bionedbrydelighed i aerobt vandigt miljø:

a) Eliminering af opløst organisk kulstof (DOC) (metode C.4-A)

b) Modificeret OECD-screeningtest — eliminering af DOC (metode C.4-B)

c) Kuldioxidudvikling (modificeret Sturm-test) (metode C.4-C)

d) Manometrisk respirometri (metode C.4-D)

e) Closed Bottle Test (metode C.4-E)

f) MITI-test (Ministry of International Trade and Industry — Japan) (metode C.4-F)

Del I indeholder generelle betragtninger og betragtninger, der gælder for alle seks test. I del II-VII findes de punkter, der er specifikke for de enkelte test. Tillæggene indeholder definitioner, formler og vejledende oplysninger.

I 1988 gennemførte OECD en ringtest, som viste, at metoderne giver indbyrdes overensstemmende resultater. Imidlertid kan en bestemt metode foretrækkes, alt efter det undersøgte stofs fysiske egenskaber.

I.2. VALG AF METODE

For at kunne vælge den bedst egnede metode er det afgørende at have kendskab til kemikaliets opløselighed, damptryk og adsorptionsegenskaber. Den kemiske struktur eller formel bør kendes for at kunne beregne den teoretiske værdi og/eller kontrollere målte værdier af parametre som f.eks. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC og COD (se bilag I og II).

Testkemikalier, der er opløselige i vand med mindst 100 mg/l og ikke-flygtige og ikke-adsorberende, kan vurderes ved alle metoderne. Af tabel 1 fremgår, hvilke metoder der er egnede for kemikalier, der er tungtopløselige i vand, flygtige eller adsorberende. I bilag III er det beskrevet, hvordan man kan bære sig ad med tungt vandopløselige og flygtige kemikalier. Kemiske stoffer med moderat flygtighed kan testes i DOC-henfaldsmetoden, hvis der er tilstrækkelig luftrum i testbeholderen (som skal tillukkes passende). I dette tilfælde skal der benyttes en abiotisk kontrolkolbe, som tillader ethvert fysisk tab.

▼B

*Tabel 1*

**Testmetodernes anvendelsesområder**

| Test | Analysemetode | Egnet til stoffer, der er: | | |
|---|---|---|---|---|
| | | tungt opløselige | flygtige | adsorberende |
| DOC-eliminering | Opløst organisk kulstof | – | – | ± |
| Mod. OECD DOC-elim. | Opløst organisk kulstof | – | – | ± |
| $CO_2$-udvikling | Respirometri: $CO_2$-udvikling | + | – | + |
| Manometrisk respirometri | Manometrisk respirometri: oxygenforbrug | + | ± | + |
| Closed Bottle | Respirometri: opløst oxygen | ± | + | + |
| MITI | Respirometri: oxygenforbrug | + | ± | + |

Oplysninger om testmaterialets renhed eller forholdet mellem dets hovedtebstanddele er nødvendige for fortolkning af de fundne resultater, især hvis de er små eller usikre.

Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for bakterier (bilag IV) kan være til nytte ved valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

I.3. REFERENCESTOFFER

Til kontrol af fremgangsmåden benyttes der referencestoffer, som opfylder kriterierne for let bionedbrydelighed, og som testes i en separat kolbe parallelt med de øvrige prøver.

Anilin (frisk destilleret), natriumacetat og natriumbenzoat er egnede kemikalier. Alle disse referencekemikalier nedbrydes ved disse metoder, selv når der ikke tilsættes inoculum.

Det har været fremført, at man burde finde frem til et referencekemikalie, der er let nedbrydeligt men kræver tilsætning af inoculum, selv i Closed Bottle-metoden. Kaliumhydrogenphthalat har været foreslået, men der mangler endnu konkret bevis med dette stof, før det kan accepteres som et referencestof.

I metoder, der er baseret på respirometri, kan nitrogenholdige forbindelser påvirke oxygenoptagelsen på grund af nitrifikation (se bilag II og V).

I.4. TESTMETODERNES PRINCIP

Teststoffet opløses eller opslæmmes i et uorganisk medium, inoculeres og inkuberes under aerobe forhold i mørke eller dæmpet lys. Den del af DOC i opløsningen, der stammer fra inoculum, skal være så lavt som muligt i forhold til den del, der stammer fra teststoffet. Der tages hensyn til inoculums endogene aktivitet ved at køre parallelle blindprøver med inoculum men uden teststof i opløsningen, selvom cellernes endogene aktivitet under tilstedeværelse af stoffet ikke præcis svarer til denne i den endogene kontrol. Et referencestof benyttes parallelt for at kontrollere, hvorledes procedurerne fungerer.

▼B

I reglen følges nedbrydningen ved bestemmelse af parametre såsom DOC, $CO_2$-dannelse og oxygenoptagelse, og der foretages målinger med tilstrækkeligt hyppige intervaller, således at begyndelsen og afslutningen af bionedbrydningen kan identificeres. Med automatiske respirometre sker målingen kontinuerligt. Undertiden måles både DOC og en anden parameter, men det er normalt kun tilfældet ved testens begyndelse og slutning. Der kan også anvendes specifik kemisk analyse til bedømmelse af den primære nedbrydning af teststoffet og til bestemmelse af koncentrationen af eventuelle mellemprodukter (obligatorisk i MITI-testen).

Normalt løber testen over 28 dage. Når bionedbrydningskurven har nået et plateau ved mindst tre målinger, kan testen dog afbrydes. Hvis kurven viser, at bionedbrydningen er begyndt men ikke har nået et plateau inden de 28 dage, kan testen forlænges ud over denne periode.

I.5. KVALITETSKRITERIER

I.5.1. **Reproducerbarhed**

Som følge af bionedbrydningens natur og den blandede bakteriepopulation i inoculum, foretages der mindst dobbeltbestemmelse.

Den almindelige erfaring er, at variationen mellem gentagelser bliver mindre, desto større startkoncentrationen af mikroorganismer i testmediet er. Ringtest har desuden vist, at der kan være betydelige forskelle mellem de resultater, forskellige laboratorier når frem til, men der opnås generelt god overensstemmelse med let bionedbrydelige forbindelser.

I.5.2. **Testens gyldighed**

En test anses for gyldig, hvis forskellene mellem de to yderste værdier for teststoffets forsvinden ved en multibestemmelse i plateau-fasen, ved afslutningen af testen eller ved afslutningen af 10 døgns-vinduet er mindre end 20 %, og hvis den procentvise nedbrydning af referencestoffet har nået niveauet for let bionedbrydelighed inden for 14 dage. Hvis ikke begge betingelser er opfyldt, gentages testen. Da metoderne er ret strikse, betyder lave værdier ikke nødvendigvis, at stoffet ikke er bionedbrydeligt under miljøforhold, men at der kræves yderligere arbejde til bestemmelse af bionedbrydeligheden.

Er nedbrydningen i en toksicitetstest med både teststof og referencekemikalie mindre end 35 % (baseret på DOC) eller 25 % (baseret på ThOD eller $ThCO_2$) på 14 dage, må testkemikaliet antages at være hæmmende (se også bilag IV). Testrækken gentages, om muligt med lavere teststofkoncentration og/eller højere inoculumkoncentration, dog højst 30 mg tørstof pr. liter.

I.6. GENERELLE PROCEDURER

De generelle betingelser for testene er sammenfattet i tabel 2. Apparatur og forsøgsomstændigheder, der er specifikke for en bestemt test, er beskrevet senere under den pågældende test.

▼B

*Tabel 2*

**Testbetingelser**

| Test | DOC-elimine-ring | $CO_2$-udvikling | Manometrisk respirometri | Modificeret OECD-scre-ening | Closed Bottle | MITI(I) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Teststofkon-centration | | | | | | |
| i mg/t | | | 100 | | 2-10 | 100 |
| mg DOC/l | 10-40 | 10-20 | | 10-40 | | |
| mg ThOD/l | | | 50-100 | | 5-10 | |
| Inoculumkon-centration (omtrentligt antal celler pr. liter) | ≤ 30 mg/l TS eller ≤ 100 ml spildev and pr. l ($10^7$-$10^8$) | | | 0,5 ml sekundært spildevand pr. l ($10^5$) | < 5 ml spil-devand pr. l ($10^4$-$10^6$) | 30 mg/l TS ($10^7$-$10^8$) |
| Grundstof-koncentration i uorganisk medium (i mg/l) | | | | | | |
| P | 116 | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 122 | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05 - 0,1 | | | | 0,05 - 0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | helst 7,0 |
| Temperatur | 22 ± 2 °C | | | | | 25 ± 1 °C |

DOC = opløst organisk kulstof ThOD = teoretisk oxygenforbrug TS = tørstof i suspension

I.6.1. **Vand**

Det deioniserede eller destillerede vand, der benyttes, må hverken indeholde toksiske stoffer (f.eks. $Cu^{++}$-ioner) i hæmmende mængder eller organisk kulstof svarende til mere end 10 % af testmaterialets organiske kulstof. Denne høje renhed er nødvendig for at undgik høje blindværdier. Forureninger kan stamme fra naturlige urenheder og fra ionbytterharpikser og lyseret materiale fra bakterier og alger. Til hver testserie anvendes kun én bestemt batch af vand, som i forvejen er kontrolleret ved DOC-analyse. En sådan kontrol er ikke nødvendig for Closed Bottle-testen, men oxygenforbruget fra vandet skal være lavt.

▼B

I.6.2. **Stamopløsninger af uorganiske medium**

Der fremstilles stamopløsninger af uorganiske medier med passende koncentrationer af salte til brug ved fremstilling af testopløsningerne. Følgende stamopløsninger kan (med forskellige fortyndingsforhold) anvendes til DOC-eliminering, modificeret OECD-screening, $CO_2$-udvikling, manometrisk respirometri og Closed Bottle-test.

Fortyndingsforholdene og for MITI-testens vedkommende fremstilling af det specifikke uorganiske medium, er anført under de enkelte metoder.

*Stamopløsninger:*

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet:

| | | |
|---|---|---|
| a) | monokaliumdihydrogenorthophosphat, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | dikaliummonohydrogenorthophosphat, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | dinatriummonohydrogenorthophosphat dihydrat, $Na_2HPO_4\ 2H_2O$ | 33,40 g |
| | ammoniumchlorid, $NH_4Cl$ | 0,50 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Opløsningens pH skal være 7,4. | |
| b) | calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | eller calciumchlorid dihydrat, $CaCl_2\ 2H_2O$ | 36,40 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |
| c) | magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4\ 7H_2O$ | 22,50 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |
| d) | jern(III)chlorid hexahydrat, $FeCl_3\ 6H_20$ | 0,25 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |

*Anmærkning:* For at undgå at skulle fremstille denne opløsning umiddelbart før brugen tilsættes der 1 dråbe koncentreret HCl eller 0,40 g ethylendiamintetraeddikesyre dinatriumsalt (EDTA) pr. liter.

I.6.3. **Stamopløsninger af kemikalier**

Hvis opløseligheden er større end 1 g/l opløses f.eks. 1-10 g af test- eller referencekemikalie i deioniseret vand, og der fortyndes til 1 liter. I modsat fald fremstilles stamopløsningen i det uorganiske medium, eller kemikaliet tilsættes direkte til det uorganiske medium. Jf. bilag III for håndtering af mindre opløselige kemikalier; dog må der i MITI-testen (metode C.4-F) hverken anvendes opløsningsmidler eller emulgatorer.

▼B

I.6.4. **Inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder, f.eks. aktivt slam, spildevandsafløb (ikke chloreret), overfladevand og -jord eller en blanding af disse. Aktivt slam til DOC-eliminering, $CO_2$-udvikling og manometrisk respirometri skal udtages fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der først og fremmest behandler husholdningsspildevand. Inoculum fra andre kilder har vist sig at føre til større spredning af resultaterne. Til den modificerede OECD-screening og Closed Bottle-testen kræves der et mere fortyndet inoculum uden slampartikler, og som kilde foretrækkes sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg for husholdningsspildevand eller et anlæg i laboratorieskala. Til MITI-testen fremstilles inoculum fra en blanding af kilder, hvilket er beskrevet under denne specifikke test.

I.6.4.1. *Inoculum fra aktivt slam*

Der udtages en frisk prøve af aktivt slam fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjern grove partikler fra ved filtrering gennem en finmasket sigte og hold herefter slammet aerobt.

Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten fjernes. Slammet kan vaskes i uorganisk medium. Det koncentrerede slam opslæmmes til en koncentration på 3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.

Slammet skal tages fra et ordentligt fungerende normalt anlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et renseanlæg, som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det genopslæmmede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam genopslæmmes i uorganisk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.

Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt genopslæmmede slam eller af det ubehandlede slam, til bestemmelse af mængden af opslæmmet tørstof.

Et andet alternativ er at homogenisere aktivt slam (3-5 g opslæmmet tørstof pr. liter). Slammet behandles i en mekanisk blender i 2 min ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i 30 min eller om nødvendigt længere, og væsken dekanteres fra til brug som inoculum i en mængde på 10 ml pr. liter uorganisk medium.

I.6.4.2. *Andre inoculumkilder*

Det kan fremstilles af sekundært afløbsvand fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Der udtages en frisk prøve, der opbevares under aerobe forhold under transporten. Den henstår til bundfældning i 1 time eller filtreres gennem et groft.papirfilter, og denne væske opbevares under aerobe forhold indtil brugen. Op til 100 ml af denne inoculumtype kan bruges pr. liter medium.

▼B

Overfladevand er en yderligere inoculumkilde. I dette tilfælde udtages en prøve af egnet overfladevand, f.eks, flod- eller søvand, som opbevares under aerobe forhold indtil anvendelsen. Om nødvendigt kan inoculum koncentreres ved filtrering eller centrifugering.

I.6.5. **Forkonditionering af inoculum**

De fremstillede inocula kan forkonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnes til testkemikaliet. Forkonditioneringen består i beluftning af aktivt slam i uorganisk medium eller af sekundært afløbsvand i 5-7 dage ved stuetemperatur. Undertiden gør forkonditionering metoderne mere præcise, idet blindværdierne reduceres. Det anses for unødvendigt at forkonditionere MITI-inoculum.

I.6.6. **Abiotiske kontrolprøver**

Om nødvendig: foretages der kontrol af eventuel abiotisk nedbrydning af teststoffet ved bestemmelse af DOC-tab, oxygenoptagelse og kuldioxidudvikling i sterile kontrolprøver, der ikke indeholder inoculum. Der steriliseres ved membranfiltrering (0,2 - 0,45 μm); eller ved tilsætning af et passende toksisk stof i passende koncentration. Hvis der benyttes membranfiltrering, skal prøverne tages aseptisk for at opretholde steriliteten. Med mindre adsorption af teststoffet i forvejen er blevet udelukket, skal test, som måler bionedbrydning som DOC-fjernelse, inkludere en abiotisk kontrol, som inoculeres og forgiftes. Dette gælder særligt for inocula med aktiveret slam.

I.6.7. **Antal kolber**

For hver test er antallet af kolber i en typisk forsøgsrække beskrevet under den enkelte metode.

Følgende typer af kolber kan bruges:

— testopslæmning: indeholder teststof og inoculum

— inoculumblind: indeholder kun inoculum

— procedurekontrol: indeholder referencestof og inoculum

— abiotisk steril kontrol: sterile, indeholder teststof (I.6.6)

— adsorptionskontrol: indeholder teststof, inoculum og steriliserende stof

— toksicitetskontrol: indeholder teststof, referencestof og inoculum.

Bestemmelser i testopslæmning og inoculumblind skal obligatorisk foretages sideløbende. Det anbefales ligeledes at foretage sideløbende bestemmelser i den anden kolbe.

Det er dog ikke altid muligt. Man må sørge for, at der udtages tilstrækkeligt med prøver eller foretages tilstrækkeligt mange aflæsninger til, at den procentvise eliminering i 10-dages-vinduet kan vurderes.

▼B

I.7. DATA OG EVALUERING

Ved beregning af den procentvise nedbrydning $D_t$ anvendes gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelserne af parameteren i testopslæmningen og inoculumblindprøven. Formlerne er givet i afsnittene om de enkelte testmetoder. Nedbrydningens forløb vises grafisk med angivelse af 10-dages-vinduet. Den procentvise eliminering ved afslutningen af 10-dages-vinduet og ved plateauet eller testens afslutning beregnes og rapporteres.

I de respirometriske test kan nitrogenholdige forbindelser indvirke på oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation (se bilag II og V).

I.7.1. **Nedbrydning målt ved bestemmelse af DOC**

Den procentuelle nedbrydning ($D_t$) på ethvert prøvetagningstidspunkt skal beregnes særskildt for kolberne, som indeholder teststof, idet gennemsnitsværdierne af dobbeltbestemmelseme af DOC benyttes for at kunne bedømme pålideligheden af testen (se I.5.2). Den beregnes ved at bruge følgende udtryk:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

hvor:

$D_t$ = % nedbrydning til tidspunktet t

$C_o$ = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum (mg DOC/l)

$C_t$ = gennemsnitskoncentration af DOC i kulturmediet med teststof og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l)

$C_{bo}$ = gennemsnitlig startkoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum (mg DOC/l)

$C_{bt}$ = gennemsnitskoncentration af DOC i blindprøve med uorganisk medium og inoculum til tidspunktet t (mg DOC/l).

Alle koncentrationer bestemmes eksperimentelt.

I.7.2. **Nedbrydning målt ved specifik analyse**

Når der foreligger specifikke analysedata, beregnes den primære bionedbrydning ved udtrykket:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

hvor

$D_t$ = % nedbrydning til tidspunktet t, normalt 28 dage

$S_a$ = restmængde teststof i medium med inoculum ved testens afslutning (mg)

$S_b$ = restmængde teststof i blindprøve kun med vand/medium og teststof (mg)

▼B

I.7.3. **Abiotisk nedbrydning**

Når en abiotisk kontrol bruges, beregnes den procentuelle abiotiske nedbrydning ved at bruge

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

hvor

$C_{S(0)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentrationen, sterilkontrollen på dag t

I.8. RAPPORTERING

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende oplysninger:

— test- og referencekemikalier og deres renhed

— testbetingelser

— inoculum: art og udtagningssted(er), koncentration og eventuel forkonditionering

— art og andel af industrispildevand i afløbsvandet, hvis kendt

— testens varighed og temperatur

— for tungt opløselige testkemikalier, den foretagne behandling

— anvendt testmetode; ændringer i fremgangsmåden skal begrundes videnskabeligt

— forsøgsresultater i skema

— eventuelt iagttagne hæmningsfænomener

— eventuelt iagttagen abiotisk nedbrydning

— eventuelle data fra specifikke kemiske analyser

— om muligt analytiske data vedrørende nedbrydningsprodukter

— afbildning af den procentvise nedbrydning mod tiden for både test- og referencestof med tydelig angivelse af lag-periode, nedbrydningstid, 10-dages-vindue og hældning (se bilag I). Hvis der i testen benyttes pålidelighedskriterier kan gennemsnittet af nedbrydningsprocenterne i kolberne indeholdende teststoffet benyttes til fremstilling af grafen

— procentvis eliminering efter 10-dages-vinduet og ved enten plateau eller testens afslutning.

DEL II. **DOC-ELIMINERING** (Metode C.4-A)

II.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

▼B

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigeret for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

II.2. BESKRIVELSE AF METODEN

II.2.1. **Apparatur**

a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 l, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

c) Filtreringsapparatur med passende membraner

d) DOC-analysator

e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

f) Centrifuge.

II.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

II.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

II.2.4. **Klargøring af kolberne**

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr. liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes inoculum fra aktivt slam eller en anden kilde (se I.6.4) til en slutkoncentration på højst 30 mg opslæmmet tørstof pr. liter. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af. om testkemikaliet har en hæmmende virkning, ved tilsætning af omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe. dvs. en kolbe uden inoculum, til undersøgelse af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6.).

▼B

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler eller lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en flaske indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se bilag II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne. Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet.

II.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: adsorptionskontrol

Kolbe 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

II.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både i 10-dages-vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages-vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendigt til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af vand (I.6.1). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet det påses, at materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se bilag II, punkt 4) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 °C eller i længere tid ved højst – 18 °C.

II.3. DATA OG RAPPORTERING

II.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1 (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2 (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

▼B

II.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Se I.5.2.

II.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

II.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

DOC-ELIMINERING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, $t_0$: … mg/l stof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULSTOFBESTEMMELSER**

Kulstofanalysator:

| | Kolbe nr. | | DOC efter n dage (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testkemikalie plus inoculum | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, gnsn. $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_1$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, gnsn. $C_{b(t)}$ | | | | | |

▼B

| | Kolbe nr. | | DOC efter n dage (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Inoculumblind-prøve uden testkemikalie | 3 | $c_1$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | c, gnsn.$C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_1$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, gnsn. $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **VURDERING AF RÅDATA**

| Kolbe nr. | | % nedbrydning efter n dage | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Gnsn. (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Gennemsnittet af $D_1$ og $D_2$ skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

*Anmærkning:* Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. **ABIOTISK KONTROL** (frivillig)

| | Tid (dage) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol | $C_{s(0)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYSE** (frivillig)

| | Restmængde af teststof ved afslutning af test (mg/l) | % primær nedbrydning |
|---|---|---|
| Sterilkontrol | $S_b$ | |

▼B

| | Restmængde af teststof ved afslutning af test (mg/l) | % primær nedbrydning |
|---|---|---|
| Inoculerer testmedium | $S_a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

DEL III. **MODIFICERET 0ECD-SCREENINGTEST** (Metode C.4-B)

III.1. METODENS PRINCIP

Til en afmålt mængde uorganisk medium indeholdende teststof i kendt koncentration (10-40 mg/l) som den nominelle eneste organisk kulstofkilde, tilsættes der 0,5 ml spildevandsinoculum pr. liter. Blandingen beluftes i mørke eller dæmpet lys ved 22 ± 2 °C.

Nedbrydningen følges ved hyppig DOC-analyse i en periode på 28 dage. Bionedbrydningsgraden beregnes ved at udtrykke koncentrationen af fjernet DOC (korrigere' for koncentrationen i inoculumblindprøven) i procent af startkoncentrationen af DOC. Den primære bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende kemisk analyse ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

III.2. BESKRIVELSE AF METODEN

III.2.1. Apparatur

a) Koniske kolber, f.eks. 250 ml op til 2 1, afhængigt af det volumen, der kræves til DOC-analyse

b) Rysteapparat til de koniske kolber, enten med automatisk temperaturkontrol eller anbragt i et lokale med konstant temperatur, og tilstrækkelig kraftigt til, at forholdene holdes aerobe i alle kolberne

c) Filtreringsapparatur med passende membraner

d) DOC-analysator

e) Apparatur til bestemmelse af opløst oxygen

f) Centrifuge.

III.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

I denne metode anvendes der kun 0,5 ml spildevand pr. liter som.inoculum, og derfor kan det være nødvendigt at tilsætte yderligere sporstoffer og vækstfaktorer til mediet. Dette gøres ved tilsætning af 1 ml af hver af følgende opløsninger pr, liter medium (slutvolumen).

▼B

Opløsning af sporstoffer:

| | |
|---|---|
| Mangansulfat tetrahydrat, $MnSO_4$ 4H,0 | 39,9 mg |
| Borsyre, $H_3BO_4$ | 57,2 mg |
| Zinksulfat heptahydrat, $ZnSO_4$ $7H_2O$ | 42,8 mg |
| Ammoniumheptamolybdat $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ | 34,7 mg |
| Jernchelat ($FeCl_3$ ethylendiamintetraeddikesyre) | 100,0 mg |

opløses i vand og fortyndes til 1 000 ml.

Vitaminopløsning:

| | |
|---|---|
| Gærekstrakt | 15,0 mg |

opløses i 100 ml vand. Der steriliseres ved filtrering igennem 0,2 μm membranfilter, hvis opløsningen friskfremstilles hver gang.

III.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inokulum tages fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningsspildevand. Se I.6.4.2 og I.6.5.

0,5 ml pr. liter uorganisk næringsstofopløsning benyttes.

III.2.4. **Klargøring af kolberne**

Eksempelvis kan der overføres 800 ml portioner af uorganisk medium til koniske 2-liters kolber, hvorefter der tilsættes så meget af stamopløsningerne af test- og referencestof til de forskellige kolber, at kemikaliekoncentrationen bliver på 10-40 mg DOC pr, liter. Kontroller pH-værdier og juster om nødvendigt til 7,4. Der tilsættes 0,5 ml spildevand pr. liter (se I.6.4.2.) til kolberne som inoculum. Der klargøres også inoculumkontrolprøver i uorganisk medium uden test- og referencekemikalier.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes omtrent lige store mængder test- og referencekemikalie til uorganisk medium indeholdende inoculum.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6).

Hvis testkemikaliet mistænkes for i væsentlig grad at kunne adsorberes til glas, slampartikler eller lign., foretages desuden en indledende vurdering af denne adsorption og dermed af testens egnethed for det pågældende testkemikalie (se tabel 1). Benyt en kolbe indeholdende teststoffet, inoculum og det steriliserende stof.

Alle kolber fyldes op til 1 liter med uorganisk medium, og efter blanding udtages der en prøve af hver kolbe til bestemmelse af startkoncentrationen af DOC (se tillæg II, punkt 4). Kolbernes åbning tildækkes, f.eks. med aluminiumfolie, på en sådan måde, at luften frit kan passere ind og ud af kolberne, Dernæst startes testen ved, at kolberne anbringes i rysteapparatet,

▼B

III.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: adsorptionskontrol

Kolbe 8: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

III.2.6. **Gennemførelse af testen**

Under testens forløb foretages der dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i alle kolberne med bestemte tidsintervaller og så ofte, at både 10-dages vinduets start og den procentvise fjernelse ved 10-dages-vinduets afslutning kan konstateres. Der udtages kun netop så meget af testopslæmningen, som er nødvendig til analysen.

Inden prøveudtagningen kompenseres der for eventuelt fordampningstab fra kolberne ved tilsætning af fortyndingsvand (I.6.1.). Inden prøven udtages, blandes kulturmediet omhyggeligt, idet materiale på kolbens sider først bringes i opløsning eller opslæmning. Der centrifugeres eller filtreres på membranfilter (se bilag II.4.) straks efter prøveudtagningen. Den filtrerede eller centrifugerede prøve analyseres samme dag; ellers kan den opbevares i højst 48 timer ved 2-4 °C eller i længere tid ved højst – 18 °C.

III.3. DATA OG RAPPORTERING

III.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den procentvise nedbrydning til tidspunktet t beregnes som anført under I.7.1. (DOC-bestemmelse) og eventuelt som under I.7.2. (specifik analyse).

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

III.3.2. Resultaternes gyldighed

Se I.5.2.

III.3.3. Rapportering

Se I.8.

III.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MODIFICERET OECD-SCREENINGTEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

▼B

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i mediet, $t_0$: … mg/l stof

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULSTOFBESTEMMELSER**

Kulstofanalysator:

| | Kolbe nr. | | DOC efter n dage (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Testkemikalie plus inokulum | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, gnsn. $Ca_{(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_1$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, gnsn. $Cb_{(t)}$ | | | | | |
| Inoculumblind-prøve uden testkemikalie | 3 | $C_1$ | | | | | |
| | | $C_2$ | | | | | |
| | | C, gnsn. $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_1$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, gnsn. $Cd_{(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **VURDERING AF RÅDATA**

| Kolbe nr. | | % nedbrydning efter n dage | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |

▼B

| Kolbe nr. | | % nedbrydning efter n dage | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Gnsn. (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Gennemsnittet af $D_1$ og $D_2$ skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

*Anmærkning*: Der kan benyttes tilsvarende formler for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

7. **ABIOTISK KONTROL** (frivillig)

| | Tid (dage) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| DOC-koncentration (mg/l) i sterilkontrol | $C_{s(o)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning } = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMISK ANALYSE** (frivillig)

| | Restmængde af teststof ved afslutning af test | % primær nedbrydning |
|---|---|---|
| Sterilkontrol | $S_b$ | |
| Inoculeret testmedium | $S_a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

DEL IV. $CO_2$-UDVIKLING (Metode C.4-C)

IV.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (10-20 mg DOC eller TOC/1) beluftes ved gennemledning af kuldioxidfri luft med kontrolleret hastighed i mørke eller i diffust lys. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved bestemmelse af den dannede mængde kuldioxid, idet den opsamles i barium- eller natriumhydroxid og måles enten ved titrering af det resterende hydroxid eller som uorganisk kulstof. Den mængde kuldioxid, som er udviklet af testkemikaliet (korrigeret for inoculumblindværdien), udtrykkes i procent af $ThCO_2$. Graden af bionedbrydning kan også beregnes ud fra supplerende DOC-analyser ved inkubationsperiodens begyndelse og afslutning.

▼B

IV.2. BESKRIVELSE AF METODEN

IV.2.1. **Apparatur**

a) Kolber, 2-5 l, alle forsynet med beluftningsrør, der næsten når ned til bunden af beholderen, og afgangsåbning

b) Magnetomrørere, når der testes tungtopløselige kemikalier

c) Gasabsorptionsflasker

d) Udstyr til styring og måling af luftgennemstrømning

e) Apparatur til udvaskning af kuldioxid, til fremstilling af kuldioxidfri luft; alternativt kan der benyttes $CO_2$-fri oxygen og $CO_2$-fri nitrogen på stålflaske i det rette blandingsforhold (20 % $O_2$ og 80 % $N_2$)

f) Udstyr til bestemmelse af kuldioxid, enten titrimetrisk eller ved en eller anden form for analysator for uorganisk kulstof

g) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

h) DOC-analysator (valgfri).

IV.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af sumopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

IV.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

IV .2.4. **Klargøring af kolberne**

Følgende volumen- og vægtangivelser gælder som eksempel for 5-liters kolber med 3 l opslæmning. Anvendes der mindre rumfang, tilpasses værdierne, dog skal den dannede mængde kuldioxid kunne bestemmes nøjagtigt.

Der overføres 2 400 ml uorganisk medium til hver 5-liters kolbe. Der tilsættes så meget klargjort aktivt slam (se I.6.4.1 og I.6.5), at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver højst 30 mg/l i de 3 liter slutblanding. Alternativt kan det klargjorte slam først fortyndes med uorganisk medium til en opslæmning indeholdende 500-1 000 mg/l, hvorefter en del heraf tilsættes til 5-liters kolbens indhold til en koncentration på 30 mg/l; dette giver større nøjagtighed. Der kan benyttes andre inoculumkilder (se I.6.4.2).

Disse blandinger beluftes natten over med $CO_2$-fri luft, så al kuldioxiden drives ud af systemet.

▼B

Test- og referencestof tilsættes hver for sig som v.h.a. kendte mængder af stamopløsninger til replikakolberne, så der opnås en koncentration på 10-20 mg DOC eller TOC pr. liter; til nogle af kolberne tilsættes der ingen kemikalier, og de fungerer som inoculumkontrolprøver. Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte til kolberne på vægt- eller volumenbasis, eller håndteres som beskrevet i bilag III.

Om nødvendigt kan der medtages en kolbe til kontrol af, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie til samme koncentration som i de andre kolber.

Der kan også om nødvendigt inkluderes en steril kolbe, dvs. en kolbe uden inoculum, til kontrol af, om testkemikaliet nedbrydes abiotisk (se I.6.6}. Steriliser ved tilsætning af et giftigt stof i en passende koncentration.

1 alle kolberne fyldes der op til et opslætnningsvolumen på 3 l ved tilsætning af uorganisk medium, der i forvejen er gennemluftet med $CO_2$-fri luft. Der kan eventuelt udtages prøver til DOC-analyse (se bilag II.4) og/eller specifik analyse. Absorptionsflaskerne forbindes til kolbernes afgangsåbning.

Hvis der anvendes bariumhydroxid, serieforbindes der 3 absorptionsflasker med hver 100 ml 0,0125 M bariumhydroxidopløsning til hver 5-liters kolbe. Opløsningen skal være fri for bundfald af sulfat og carbonat, og dens styrke skal bestemmes umiddelbart før brugen. Anvendes der natriumhydroxid forbindes der 2 fælder, hvor den sidste fungerer som kontrol af, at al kuldioxiden er absorberet i den første. Absorptionsflasker med serumflaskelukker er egnede. Der anbringes 200 ml 0,05 M natriumhydroxid i hver flaske, hvilket er tilstrækkeligt til at absorbere hele den mængde kuldioxid, der udvikles, når testkemikaliet nedbrydes fuldstændigt. Selv en friskfremstillet natriumhydroxidopløsning vil altid indeholde spor af carbonat; dette korrigeres der for ved subtraktion af blindprøvens carbonatindhold.

IV.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

IV.2.6. **Gennemførelse af testen**

Testen indledes ved gennembobling af opslæmningerne med 30-100 ml $CO_2$-fri luft pr. minut. Der udtages regelmæssigt prøver af kuldioxidabsorbenten til analyse for $CO_2$-indhold. Det anbefales, at der i de første 10 dage foretages analyser hver anden eller tredje dag og derefter hver femte dag indtil den 28. dag, således at 10-dagesvinduet kan identificeres.

▼B

På den 28. dag udtages der (eventuelt) prøver til DOC-analyse og/eller specifik analyse, opslæmningernes pH måles, og der tilsættes 1 ml koncentreret saltsyre til hver kolbe; kolberne beluftes natten over, så al kuldioxid drives ud af testopslæmningerne. På den 29. dag foretages den sidste analyse af udviklet kuldioxid.

På de dage, hvor $CO_2$ bestemmes, fjernes den bariumhydroxidabsorptionsflaske, der er nærmest kolben, og indholdet titreres med 0,05 M HCl med phenolphthalein som indikator. De øvrige absorptionsflasker rykkes én plads nærmere kolben, og der anbringes en ny flaske indeholdende 100 ml friskfremstillet 0,0125 M bariumhydroxyd bagest i serien. Titreringerne foretages efter behov, f.eks. når der er betragteligt bundfald i den første flaske og intet synligt i den anden, dog mindst én gang ugentligt. Anvendes der NaOH som absorptionsmiddel, udtages der med en injektionssprøjte en lille prøve (afhængigt af den anvendte kulstofanalysator) af natriumhydroxidopløsningen i den flaske, der er nærmest ved kolben. Prøven sprøjtes ind i IC-delen af kulstofanalysatoren til direkte analyse af den udviklede kuldioxid.

Indholdet af den anden absorptionsflaske analyseres først ved testens afslutning, så der kan korrigeres for eventuel overførsel af kuldioxid.

IV.3. DATA OG RAPPORTERING

IV.3.1. **Behandling af resultaterne**

Den absorberede $CO_2$-mængde er efter titrering givet ved:

$$\text{mg } CO_2 = [(100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A)] \times 44$$

hvor:

V = den mængde HCl, der forbruges til titrering af de 100 ml absorptionsmiddel (ml)

$C_B$ = bariumhydroxidopløsningens koncentration (M)

$C_A$ = saltsyreopløsningens koncentration (M).

Hvis $C_B$ = 0,0125 M og $C_A$ = 0,05 M, skal der anvendes 50 ml til titrering af 100 ml bariumhydroxid, og $CO_2$-mængden er givet ved:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl til titrering} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

I dette tilfælde skal der altså anvendes en faktor på 1,1 ved omregning fra det rumfang HCl, der medgår til titrering, til det antal mg $CO_2$, der er udviklet.

Den vægtmængde $CO_2$, der dannes af inoculum alene og af inoculum plus testkemikalie, beregnes ud fra de pågældende titreringsværdier, og forskellen er den vægtmængde $CO_2$, som testkemikaliet alene udvikler.

Hvis f.eks. inoculum alene kræver 48 ml til titreringen og inoculum plus testkemikalie kræver 45 ml, fås

$CO_2$ fra inoculum = 1,1 × (50-48) = 2,2 rng

▼B

$CO_2$ fra inoculum plus testkemikalie = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

og den vægtmængde $CO_2$, som testkemikaliet har udviklet, bliver altså 3,3 mg.

Den procentvise bionedbrydning beregnes ved:

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg tilsat testkemikalie}}$$

eller

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{mg udviklet } CO_2 \times 100}{\text{mg tilsat TOC i testen} \times 3,67}$$

idet 3,67 er omregningsfaktoren (44/12) fra kulstof til kuldioxid.

Den procentvise nedbrydning efter et givet tidsrum beregnes ved summering af de enkelte procentdele af $ThCO_2$, der er målt indtil det pågældende tidspunkt.

Anvendes der natriumhydroxid som absorptionsmiddel, beregnes den udviklede $CO_2$- mængde, udtrykt som IC (mg), ved multiplikation af absorptionsmidlets IC- koncentration med dets volumen.

Den procentvise nedbrydning beregnes ved:

$$\% ThCO_2 = \frac{\text{mg IC i testkolbe} - \text{mg IC i blindprøve}}{\text{mg TOC tilsat som testkemikalie}} \times 100$$

Det fjernede DOC beregnes (eventuelt) som beskrevet under I.7. Dette og alle øvrige resultater noteres på de tilhørende skemaer.

IV.3.2. **Resultaternes gyldighed**

IC-indholdet i testkemikalieopslæmningen i uorganisk medium ved testens begyndelse skal være mindre end 5 % af TC, og den udviklede $CO_2$-mængde i inoculumblindprøven må ved testens afslutning normalt ikke overstige 40 mg pr. liter medium. Hvis der findes værdier på over 70 mg $CO_2$ pr. liter, gennemgås data og forsøgsteknikker kritisk.

Se også I.5.2.

IV.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

IV.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

KULDIOXIDUDVIKLING

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

▼B

Begyndelseskoncentration i mediet: … mg/l stof

Total C tilsat til kolben: … mg C

$ThCO_2$: … $mgCO_2$

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof i reaktionsblandingen: … mg/l

5. **KULDIOXIDUDVIKLING OG NEDBRYDELIGHED**

Metode: $Ba(OH)_2$/NaOH/andet

| Tid (dage) | udviklet $CO_2$ test (mg) | | udviklet $CO_2$ blind (mg) | | udviklet $CO_2$ kumuleret (mg) (test minus blindprøve) | | % $ThCO_2$ kumuleret $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 / 2 | gnsn. | 3 / 4 | gnsn. | 1 | 2 | 1 | 2 | gnsn. |
| 0 | | | | | | | | | |
| $n_1$ | | | | | | | | | |
| $n_2$ | | | | | | | | | |
| $n_3$ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | |

*Anmærkning*: Der kan benyttes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

6. **KULSTOFANALYSE** (valgfri)

Kulstofanalysator:

| Tid (dage) | Blindprøve mg/l | Testkemikalie mg/l |
|---|---|---|
| 0 | $C_{b(o)}$ | $C_o$ |
| 28 (*) | $C_{b(t)}$ | $C_t$ |

(*) eller ved inkuberingens afslutning.

▼B

$$\% \text{ DOC fjernet } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTISK NEDBRYDNING** (valgfri)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning } = \frac{CO_2 - \text{udvikling i steril kolbe efter 28 dage (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEL V. **MANOMETRISK RESPIROMETRI** (Metode C.4-D)

V.1. METODENS PRINCIP

En afmålt mængde uorganisk medium indeholdende inoculum og, som den nominelle eneste organiske kulstofkilde, teststof i kendt koncentration (100 mg teststof pr. liter svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l) omrøres i en lukket kolbe ved konstant temperatur (± 1 ºC eller mindre) i op til 28 dage, Oxygenforbruget bestemmes enten ved måling af den mængde oxygen (fremstillet elektrolytisk), der kræves til opretholdelse af konstant gasvolumen i respirometerkolben, eller ud fra volumen- eller trykændringen (eller en kombination af dem) i apparatet. Udviklet kuldioxid absorberes i en kaliumhydroxidopløsning eller andet egnet absorptionsmiddel. Den oxygenmængde, testkemikaliet har optaget (korrigeret for den parallelle inoculumblindprøves optagelse), udtrykkes som procent af ThOD eller COD. Frivilligt kan primær bionedbrydning også beregnes ved supplerende specifik analyse ved begyndelsen og slutningen af inkuberingen, og fuldstændig bionedbrydning ved analyse af DOC.

V.2. BESKRIVELSE AF METODEN

V.2.1. **Apparatur**

a) Egnet respirometer

b) Temperaturregulering inden for ± 1 ºC eller mindre

c) Membranfiltreringsapparatur (valgfrit)

d) Kulstofanalysator (valgfri).

V.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2. om fremstilling af stamopløsning.

10 ml af opløsning (a) blandes med 800 ml fortyndingsvand, og af opløsning (b), (c) og (d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 l med fortyndingsvand.

V.2.3. **Fremstilling og forkonditionering af inoculum**

Inoculum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktivt slam, spildevandsafløb, overfladevand og -jord eller en blanding af disse.

Se I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

V.2.4. **Klargøring af kolberne**

Ud fra stamopløsningerne fremstilles der særskilte opløsninger af test- og referencestof i uorganisk medium med en kemikaliekoncentration på normalt 100 mg/l (svarende til mindst 50-100 mg ThOD pr. l).

▼B

ThOD beregnes ud fra dannelsen af ammoniumsalte, medmindre der forventes nitrifikation; i så fald baseres beregningen på nitratdannelsen (se bilag II.2).

pH måles og justeres om nødvendigt til 7,4 ± 0,2.

Tungtopløselige stoffer tilsættes på et senere tidspunkt (se nedenfor).

Hvis teststoffets toksicitet skal bestemmes, fremstilles endnu en opløsning i uorganisk medium, som indeholder både test- og referencestof i samme koncentration som i de enkelte opløsninger.

Hvis bestemmelse af den fysisk-kemiske oxygenoptagelse er påkrævet, fremstilles der en opløsning af teststof i en koncentration på normalt 100 mg ThOD pr. l som er blevet steriliseret ved tilsætningen af et passende giftigt stof (se I.6.6.).

Den nødvendige mængde af henholdsvis test- og referencestofopløsningerne overføres til mindst to kolber (dobbeltbestemmelse). Der klargøres yderligere kolber med uorganisk medium alene (inoculumblindprøver) og hvis nødvendigt med den blandede test- og referencestofopløsning og med den sterile opløsning.

Hvis teststoffet er tungtopløseligt, tilsættes det direkte på dette tidspunkt, enten på vægtbasis eller volumenbasis, eller ved håndtering som beskrevet i bilag III. Der tilsættes kaliumhydroxid, natriumhydroxidperler eller et andet absorptionsmiddel til $CO_2$-absorbtionskamrene.

V.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

Kolbe 1 og 2: testopslæmning

Kolbe 3 og 4: inoculumblind

Kolbe 5: procedurekontrol

anbefalet og om nødvendigt:

Kolbe 6: abiotisk steril kontrol

Kolbe 7: toksicitetskontrol

Se I.6.7.

V.2.6. **Gennemførelse af testen**

Beholderne henstår, indtil de har nået den ønskede temperatur, og der tilsættes klargjort aktivt slam eller et andet inoculum til de pågældende beholdere, så der opnås en koncentration af opslæmmet tørstof på højst 30 mg/l. Apparaturet samles, omrøringen sættes i gang, der kontrolleres for lufttæthed, og oxygenoptagelsesmålingen påbegyndes. Normalt kræves der ikke anden pasning end de nødvendige aflæsninger og daglig kontrol af, at temperaturen er korrekt og omrøringen tilstrækkelig.

Oxygenoptagelsen beregnes på grundlag af hyppige regelmæssige aflæsninger, foretaget efter apparaturfabrikantens anvisninger. Ved inkubationsperiodens afslutning, normalt 28 dage, måles pH i kolberne, navnlig hvis oxygenoptagelsen er meget lav eller større end $ThODNH_4$ (for nitrogenholdige forbindelser).

▼B

Om nødvendigt udtages der før og efter inkuberingen prøver fra respirometerkolberne til DOC-analyse eller specifik kemisk analyse (se bilag II.4). Man skal sørge for, at rumfanget af den testopslæmning, der er tilbage i kolben efter den første prøveudtagning, er kendt. Hvis teststoffet er N-holdigt, bestemmes koncentrationsforøgelsen af nitrit og nitrat over 28 dage, og korrektionen for oxygenforbruget ved nitrifikation beregnes (bilag V).

V.3. DATA OG RAPPORTERING

V.3.1. **Behandling af resultaterne**

Testkemikaliets oxygenoptagelse (mg) efter et givet tidsrum (korrigeret for inoculumblindprøvens oxygenoptagelse i samme tidsrum) divideres med vægten af den anvendte teststofmængde. Herved fremkommer BOD udtrvkt i mg oxygen pr. mg testsrof. dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof } - \text{ mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

= mg $O_2$ pr. mg teststof.

Den procentvise bionedbrydning beregnes enten ved:

$$\%\ \text{bionedbrydning} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100,$$

eller

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg kemikalie})}{\text{COD}(\text{mg } O_2 \text{ kemikalie})} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode bør foretrækkes.

Der benyttes den ThOD ($NH_4$ eller $NO_3$), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Hvis det vælges at foretage bestemmelser af organisk kulstof og/eller af et specifikt kemikalie, beregnes den procentvise nedbrydning som beskrevet under punkt I.7.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

V.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenoptagelse er normalt 20-30 mg $O_2$/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenoptagelse er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

▼B

V.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

V.4. **RESULTATSKEMA**

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MANOMETRISK RESPIROMETRI

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l

Begyndelseskoncentration i mediet, $C_o$: … mg/l

Volumen i testkolbe (V): … ml

ThOD eller COD: … mg $O_2$/mg teststof ($NH_4$, $NO_3$)

4. **INOCULUM**

Kilde:

Behandling:

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen af opslæmmet tørstof: reaktionsblandingen: … mg/l

5. **OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDELIGHED**

| | | Tid (dage) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| $O_2$ opt. (mg) teststof | 1 | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | |
| | a, gnsn. | | | | | | | | | | | | |
| $O_2$ opt. (mg) blindprøve | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | |
| | b, gnsn. | | | | | | | | | | | | |
| Korrigeret BOD (mg) | $(a_1 - b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| | $(a_2 - b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| BOD pr. mg teststof | $\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |
| | $\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |

▼B

| | | Tid (dage) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| % nedbrydning edbrydning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | $D_1$ ($a_1$) | | | | | | | | | | | | |
| | $D_2$ ($a_2$) | | | | | | | | | | | | |
| | Gnsn. (*) | | | | | | | | | | | | |

V = volumen af medium i testkolben.
(*) Germemsnittet af $D_1$ og $D_2$ skal ikke tages, hvis der er en betydelig forskel.

*Anmærkning*: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for reference kemi kaliet og toksicitetskontrolprøveme.

6. **KORREKTION FOR NITRIFIKATION** (se bilag V)

| Dag | | 0 | 28 | forskel |
|---|---|---|---|---|
| i) | Nitratkoncentration (mg N/l) | | | (N) |
| ii) | Oxygenækvivalent (4,57 × N × V) (mg) | — | — | |
| iii) | Nitritconcentration (mg N/l) | | | (N) |
| iv) | Oxygenækvivalent (3,43 ×N × V) (mg) | — | — | |
| ii) + iv) | Total oxygenækvivalent | — | — | |

7. **KULSTOFANALYSE** (valgfri)

Kulstofanalysator:

| Tid (dage) | Blindprøve mg/l | Testkemikalie mg/l |
|---|---|---|
| 0 | ($C_{blo}$) | ($C_o$) |
| 28 (*) | ($C_{blt}$) | ($C_t$) |

(*) eller ved inkuberingens afslutning.

$$\% \text{ DOC fjernet } = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIK KEMIKALIEBESTEMMELSE** (valgfri)

$S_b$ = koncentrationen af testkemikalie i steril kontrolkolbe efter 28 dage

$S_a$ = koncentrationen af testkemikalie i kolbe med inoculum efter 28 dage

$$\% \text{ biodegradation } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTISK NEDBRYDNING** (valgfri)

a = oxygenforbruget i sterile kolber efter 28 dage (mg)

$$\text{Oxygenforbrug pr. mg teststof } = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(se afsnit 1 og 3)

$$\% \text{ abiotisk nedbrydning} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

DEL VI. **CLOSED BOTTLE TEST** (metode C.4-E)

VI.1. TESTMETODENS PRINCIP

Til en sædvanligvis 2-5 mg/l opløsning af teststoffet i uorganisk medium tilsættes der inoculum bestående af et forholdvis lille antal mikroorganismer fra en blandet population, og opløsningen opbevares i mørke ved konstant temperatur i helt fyldte lukkede kolber. Nedbrydningen følges gennem 28 dage ved analyse af opløst oxygen. Den oxygenmængde, som teststoffet har forbrugt, korrigeres for den oxygenmængde, der er forbrugt i den parallelle inoculumblindprøve, og udtrykkes i procent af ThOD eller COD.

VI.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VI.2.1. **Apparatur**

a) BOD-kolber med glasprop, f.eks. 250-300 ml

b) vandbad eller inkuberingsapparat, som kan holde kolberne ved konstant temperatur (± 1 °C eller mindre) i mørke

c) store glasflasker (2-5 l) til fremstilling af medium og opfyldning af BOD-kolberne

d) oxygenelektrode og -måler eller udstyr og reagenser til Winkler-titrering.

VI.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Se I.6.2 om fremstilling af stamopløsning.

1 ml af opløsning (a), (b), (c) og (d) fortyndes til 1 liter med vand.

VI.2.3. **Fremstilling af inoculum**

Inoculum tages normalt fra det sekundære afløb fra et spildevandsanlæg eller et laboratorieanlæg, som fortrinsvis modtager husholdningspildevand. En alternativ inoculumkilde er overfladevand. Brug normalt fra en dråbe (0,05 ml) til 5 ml filtrat pr. liter medium. Afprøvninger kan være nødvendige for at klarlægge det optimale volumen for et givet afløb (se I.6.4.2 og I.6.5).

VI.2.4. **Klargøring af kolberne**

Det uorganiske medium beluftes kraftigt i mindst 20 minutter. En given forsøgsrække udføres med uorganisk medium fra samme batch. Normalt er mediet klar til brug efter henstand i 20 timer ved testtemperaturen. Som kontrol bestemmes koncentrationen af opløst oxygen; værdien skal ligge omkring 9 mg/l ved 20 °C. Al overføring og opfyldning med det luftmættede medium udføres, uden at der dannes bobler, f.eks. med en hævert.

▼B

Der klargøres parallelle grupper af BOD-kolber til samtidige forsøg med test- og referencestof. Der samles så mange BOD-kolber, inklusive inoculumblindprøver, at der mindst kan foretages dobbeltbestemmelse af oxygenforbruget med den ønskede hyppighed, f.eks. efter 0, 7, 14, 21 og 28 dage. Det kan være nødvendigt at anvende flere kolber, hvis man vil være sikker på at kunne identificere 10-dages-vinduet.

De store kolber fyldes en tredjedel op med fuldt beluftet uorganisk medium. Dernæst tilsættes der så meget stamopløsning af test- og referencestof til forskellige kolber, at deres slutkoncentration normalt ikke bliver større end 10 mg/l. Til en særskilt kolbe med kontrolmedium tilsættes der ingen kemikalier.

For at være sikker på, at inoculumaktiviteten ikke begrænses, må koncentrationen af opløst oxygen ikke falde til under 0,5 mg/l i BOD-kolberne, hvilket begrænser testkemikaliets koncentration til ca. 2 mg/l. Af tungt nedbrydelige stoffer og stoffer med lavt ThOD kan der dog anvendes 5-10 mg/l. I visse tilfælde tilrådes det at køre parallelle serier med teststof i to forskellige koncentrationer, f.eks. 2 og 5 mg/l. Normalt beregnes ThOD på basis af dannelsen af ammoniumsalte, men hvis der forventes eller vides at ske nitrifikation, beregnes værdien på grundlag af nitratdannelsen ($ThOD_{NO3}$: se bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation korrigeres der for de ændringer i nitrit- og nitratkoncentrationen, der er bestemt ved analyse (se bilag V).

Endnu en serie kolber er påkrævet, hvis teststoffets toksicitet skal undersøges (f.eks. hvis der tidligere er fundet en lav bionedbrydelighedsværdi).

Hertil klargøres der endnu en stor kolbe med beluftet uorganisk medium (ca. en tredjedel fuld) plus teststof og referencestof normalt i samme slutkoncentrationer som i de andre kolber.

Der tilsættes inoculum til kolberne i form af sekundært afløbsvand (fra 1 dråbe (ca. 0,05 ml) til 5 ml pr. liter) eller f.eks. flodvand (se I.6.4.2). Endelig fyldes der op med beluftet uorganisk medium ved hjælp af en slange, der når helt ned til bunden, så det bliver tilstrækkelig omrøring.

VI.2.5. **Antal kolber i en typisk testrække**

I en rypisk testrække anvendes følgende antal kolber:

— mindst 10 med teststof og inoculum (restopslæmning)

— mindst 10 kun med inoculum (inoculumblindprøve)

— mindst 10 med referencestof og inoculum (procedurekontrol)

▼B

— og i givet fald 6 kolber med teststof, referencestof og inoculum (toksicitetskontrol). Til sikker identifikation af 10-dages-vinduet kræves der dog det dobbelte antal kolber.

VI.2.6. Gennemførelse af testen

De fremstillede opløsninger fordeles straks i de pågældende grupper af BOD-kolber, idet de suges op fra den nederste fjerdedel af den passende store kolbe (ikke bunden) med en slange, og således at alle BOD-kolberne fyldes helt. Eventuelle luftbobler fjernes ved en let banken på kolbens side. Starttidskolberne analyseres straks for opløst oxygen enten ved Winklers metode eller med elektrode. Indholdet i kolberne kan opbevares til senere analyse efter Winklers metode, hvis der straks tilsættes mangan(II)sulfat og natriumhydroxid (det første Winkler- reagens). De omhyggeligt tilproppede kolber, hvor oxygenet er fikseret som brunt hydratiseret mangan(III)oxid, opbevares i mørke ved 10-20 °C i højst 24 timer, inden Winkler-testen gøres færdig. De resterende kolber tiilproppes, idet man sørger for, at der ikke indesluttes nogen luftbobler, og de inkuberes ved 20 °C i mørke. Parallelt med hver serie skal der være en fuldstændig serie til bestemmelse af inoculumblindværdien. Under de 28 dages inkubering udtages der med bestemte mellemrum (mindst en gang om ugen) mindst 2 kolber af hver serie til analyse for opløst oxygen.

Med ugentlig prøveudtagning skulle den procentvise fjernelse kunne bedømmes i et 14-dages-vindue, mens der ved prøveudtagning hver tredje til fjerde dag, hvilket kræver omtrent det dobbelte antal kolber, bliver mulighed for identificering af 10-dages-vinduet.

For N-holdige stoffers vedkommende må der korrigeres for oxygenforbrug ved eventuel nitrifikation. Hertil anvendes der en $O_2$-elektrode til bestemmelse af koncentrationen af opløst oxygen, hvorefter der udtages en prøve fra BOD-kolben til analyse for nitrit og nitrat. Den forbrugte oxygenmængde beregnes på grundlag af forøgelsen i nitrit- og nitratkoncentrationen (se bilag V).

V.3. DATA OG RAPPORTERING

VI.3.1. **Behandling af resultaterne**

Først beregnes BOD efter hvert tidsinterval ved at trække oxygentabet (mg $O_2$ pr. l) i inoculumblindprøven fra oxygentabet i kolben med teststof. Dette korrigerede oxygentab divideres med teststoffets koncentration (mg/l), hvorved den specifikke BOD fremkommer i mg oxygen pr. mg teststof. Den procentvise bionedbrydelighed beregnes ved at dividere den specifikke BOD med den specifikke ThOD (beregnet som anført i bilag II.2) eller COD (bestemt ved analyse, se bilag II.3), dvs.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststof} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

▼B

= mg $O_2$ pr. mg teststof.

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg teststof)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

eller

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg teststof)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

Det bemærkes, at de to metoder ikke nødvendigvis giver samme resultat; førstnævnte metode foretrækkes.

Der benyttes den ThOD ($NH_4$ eller $NO_3$), der svarer til det foreliggende kendskab til nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

VI.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygentab bør ikke være større end 1,5 mg opløst oxygen pr. liter efter 28 dage. Findes der højere værdier, må forsøgsteknikkerne gennemgås kritisk. Restkoncentrationen af oxygen i testkolberne må ikke falde til under 0,5 mg/l på noget tidspunkt. Målinger af så lavt oxygenindhold er kun gyldige, hvis den anvendte målemetode for opløst oxygen tillader nøjagtig måling af så lave indhold.

Se også I.5.2.

VI.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VI.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

CLOSED BOTTLE TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

3. **TESTSTOF**

   Navn:

   Stamopløsningens koncentration: … mg/l

   Begyndelseskoncentration i kolbe: … mg/l

   ThOD eller COD: … mg $O_2$/mg teststof

4. **INOCULUM**

   Kilde:

   Behandling:

▼B

Eventuel forkonditionering:

Koncentrationen i reaktionsblandingen: … ml/l

5. **DO-BESTEMMELSE**

Metode: Winkler/elektrode

**Kolbeanalyser**

| Inkuberingstid (dage) | | | DO (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | |
| Blindprøve (uden teststof) | 1 | $C_1$ | | | | |
| | 2 | $C_2$ | | | | |
| Gennemsnit | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ | | | | | |
| Teststof | 1 | $a_1$ | | | | |
| | 2 | $a_2$ | | | | |
| Gennemsnit | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | | |

*Anmærkning*: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne

6. **KORREKTION FOR NITRIFIKATION** (se bilag V)

| Inkuberingstid (dage) | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ |
|---|---|---|---|---|---|
| i) | Nitratkoncentration (mg N/l) | | | | |
| ii) | Ændring i nitratkoncentration (mg N/l) | — | | | |
| iii) | Oxygenækvivalent (mg/l) | — | | | |
| iv) | Nitritkoncentration (mg N/l) | | | | |
| v) | Ændring i nitritkoncentration (mg N/l) | — | | | |
| vi) | Oxygenækvivalent (mg/l) | — | | | |
| iii) + vi) | Total oxygenækvivalent (mg/l) | — | | | |

7. **TAB AF DO: % NEDBRYDNING**

| | Tab efter n dage (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| Kolbe 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |
| Kolbe 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |

▼B

| | Tab efter n dage (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| Kolbe 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$ | | | | |
| Kolbe 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{konc. af test} \times \text{ThOD for stof}}$ | | | | |
| $\%\ D\ \text{gnsn.}\ (*)\ \frac{D_1 - D_2}{2}$ | | | | |

(*) Tag ikke gennemsnittet, hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

$m_{to}$ = værdi i testkolbe til tid 0

$m_{tx}$ = værdi i testkolbe til tid x

$m_{bo}$ = gennemsnitsblindværdi til tid 0

$m_{bx}$ = gennemsnitsblindværdi til tid x

Der foretages desuden korrektion for nitrifikation som beregnet i punkt 6.

8. **BLINDPRØVER FOR TAB AF DO**

Oxygenforbrug i blindprøve: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/l. Dette forbrug har betydning for testens gyldighed og må højst være 1,5 mg/l.

DEL VII. **MITI-TEST** (Metode C.4-F)

VII.1. METODENS PRINCIP

Oxygenoptagelsen i en omrørt opløsning eller opslæmning af teststoffet i uorganisk medium, som er tilsat inoculum i form af særligt dyrkede ikke-tilvænnede mikroorganismer, måles automatisk gennem en periode på 28 dage i et mørklagt lukket respirometer ved 25 ± 1 °C. Den udviklede kuldioxid absorberes i natriumhydroxid. Bionedbrydeligheden udtrykkes som den optagne oxygenmængde (korrigeret for blindprøvens optagelse) i procent af den teoretiske oxygenoptagelse (ThOD). Også den procentvise primære bionedbrydelighed beregnes, nemlig på grundlag af supplerende specifikke kemiske analyser ved inkuberingens begyndelse og slutning og eventuelt ved DOC-analyse.

VII.2. BESKRIVELSE AF METODEN

VII.2.1. **Apparatur**

a) Automatisk elektrolytisk BOD-meter eller respirometer, normalt med 6 kolber på hver 300 ml og med skåle til $CO_2$-absorptionsmiddel

▼B

b) Lokale med konstant temperatur og/eller vandbad på 25 ± 1 °C eller mindre

c) Membranfiltreringsudstyr (valgfrit)

d) Kulstofanalysator (valgfri).

VII.2.2. **Fremstilling af uorganisk medium**

Følgende stamopløsninger fremstilles ud fra reagenser af analysekvalitet og vand (I.6.I):

| | | |
|---|---|---|
| a) | monokaliumdihydrogenorthophosphat, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | dikaliummonohydrogenorthophosphat, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | dinatriummonohydrogenorthophosphat dodecahydrat, $Na_2HPO_4$ 12 $H_2O$ | 44,60 g |
| | ammoniumchlorid, $NH_4Cl$ | 1,70 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |
| | Opløsningens pH skal være 7,2. | |
| b) | magnesiumsulfat heptahydrat, $MgSO_4$ 7 $H_2O$ | 22,50 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |
| c) | calciumchlorid, vandfrit, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | Opløses 1 vand og fortyndes til 1 liter. | |
| d) | jern(III)chlorid hexahydrat, $FcCl_3$ 6 $H_2O$ | 0,25 g |
| | Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. | |

Der udtages 3 ml af opløsning a), b), c) og d), som fortyndes til 1 liter.

VII.2.3. **Fremstilling af inoculum**

Der indsamles friske prøver fra mindst 10 lokaliteter, hovedsagelig områder, hvor der anvendes og udledes forskellige kemikalier. Fra sådanne lokaliteter som spildevandsanlæg, vandløb, søer og havområder indsamles 1-liters prøver af slam, overfladejord, vand, mv., og det hele blandes grundigt. Materiale, der flyder ovenpå, fjernes, og efter henstand indstilles supernatantens pH til 7 ± 1 med natriumhydroxid og phosphorsyre.

Der benyttes en passende mængde filtrat til at fylde en »fill-and-draw« aktiv slambeholder, og væsken beluftes i ca. 23 1/2 time. 30 minutter efter at beluftningen er standset, borthældes ca. 1/3 af det samlede supernatantvolumen, og der tilsættes en lige så stor mængde af en opløsning (med pH 7), der indeholder 0,1 % glucose, 0,1 % pepton og 0,1 % monokaliumorthophosphat, og beluftningen genoptages. Dette gentages hver dag. Slamenheden drives efter god praksis: Afløbsvandet skal være klart, temperaturen skal holdes på 25 ± 2 °C, pH skal være 7 ± 1, slam skal bundfældes godt, tilstrækkelig beluftning skal opretholdes for at holde blandingen aerob hele tiden, protozoer skal være til stede, og slamaktiviteten skal testes mod referencestoffet mindst hver tredje måned. Slammet må tidligst anvendes som inoculum efter en måneds drift og ikke senere end efter fire måneders drift. Derefter udtages der regelmæssigt prøver fra mindst 10 lokaliteter hver tredje måned.

▼B

For at holde det friske og det gamle slam på samme aktivitet, blandes den filtrerede supernatant fra aktivt slam i brug med en lige så stor mængde filtreret supernatant fra en frisk indsamlet blanding fra 10 kilder, og denne væske opdyrkes som ovenfor nævnt. 18-24 timer efter at enheden er fyldt op, kan der udtages slam til brug som inoculum.

VII.2.4. **Klargøring af kolber**

Der klargøres 6 kolber som følger:

nr. 1: teststof i fortyndingsvand, 100 mg/l

nr. 2, 3 og 4: teststof fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 5: referencestof (f.eks. anilin) fortyndet med uorganisk medium til 100 mg/l

nr. 6: rent uorganisk medium

Tungtopløselige teststoffer tilsættes direkte på vægt- eller volumenbasis eller håndteres som beskrevet i bilag III, bortset fra, at der hverken må benyttes opløsningsmidler eller emulgatorer. Der anbringes $CO_2$-absorptionsmiddel i alle kolber i den særlige skål. pH i kolbe nr. 2, 3 og 4 justeres til 7,0.

VII.2.5. **Gennemførelse af testen**

Der tilsættes en lille mængde inoculum til kolbe nr. 2, 3 og 4 (testopslæmninger), nr. 5 (aktivitetskontrol) og nr. 6 (inoculumblindprøve), således at koncentrationen af opslæmmet tørstof bliver på 30 mg/l. Der tilsættes ikke inoculum til kolbe nr. 1, der tjener som abiotisk kontrol. Udstyret samles, der kontrolleres for lufttæthed, omrørerne startes, og oxygenoptagelsesmålingen startes i mørke. Temperaturen, omrøringen og den coulometriske oxygenoptagelsesskriver kontrolleres dagligt, og eventuelle farveændringer i kolberne noteres. Oxygenoptagelsen i de 6 kolber aflæses direkte v.h.a. en passende metode, f.eks. på sekskanalsskriveren, som giver en BOD-kurve. Ved inkuberingens afslutning, normalt efter 28 dage, måles pH i kolberne, og koncentrationen af resterende teststof og af eventuelle mellemprodukter og, når der er tale om vandopløselige stoffer, eventuelt DOC-koncentrationen bestemmes (bilag II.4). Der må udvises særlig omhu, når der er tale om flygtige kemikalier. Forventes der nitrifikation, bestemmes om muligt nitrat- og nitritkoncentrationen.

VII.3. DATA OG RAPPORTERING

VII.3.1. **Behandling af resultaterne**

Teststoffets oxygenfarbrug (mg) efter et givet tidsrum, korrigeret for oxygenoptagelsen i inoculumblindprøven efter samme tidsrum, divideres med den anvendte vægtmængde teststof. Herved fremkommer BOD udtrykt som mg oxygen pr. mg teststof, dvs.

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ optaget af teststoffet} - \text{mg } O_2 \text{ optaget af blindprøven})}{(\text{mg teststof i kolben})}$$

= mg $O_2$ pr. mg teststof.

▼B

Den procentvise bionedbrydning fremkommer af:

$$\%\ \text{bionedbrydning} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}}{\text{ThOD (mg } O_2/\text{mg kemikalie)}} \times 100$$

For blandinger beregnes ThOD på samme måde som for enkeltstoffer, nemlig på grundlag af grundstofanalysen. Den ThOD, der benyttes, ($ThOD_{NH4}$ eller $ThOD_{NO3}$) afhænger af, om der slet ikke sker nitrifikation eller der sker fuldstændig nitrifikation (bilag II.2). Sker der ufuldstændig nitrifikation beregnes korrektionen for oxygenforbruget til nitrifikationen ud fra ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen (bilag V).

Den procentvise primære bionedbrydning beregnes ud fra den mængde af det specifikke (oprindelige) kemikalie, der forsvinder (se I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Er der forsvundet teststof i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, anføres dette, og teststoffets koncentration ($S_b$) i denne kolbe efter 28 dage benyttes til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Foretages der (valgfrie) bestemmelser af DOC, beregnes den procentvise fuldstændige bionedbrydning ved:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

som anført under punkt I.7.1. Er der forsvundet teststof (DOC) i kolbe nr. 1, som måler fysisk og kemisk nedbrydning, benyttes DOC-koncentrationen i denne kolbe til beregning af den procentvise bionedbrydning.

Alle resultater noteres på de tilhørende skemaer.

VII.3.2. **Resultaternes gyldighed**

Inoculumblindprøvens oxygenforbrug er normalt 20-30 mg $O_2$/l på 28 dage og bør ikke være større end 60 mg/l. Findes der værdier over 60 mg/l, må data og forsøgsteknikker gennemgås kritisk. Hvis pH ligger uden for intervallet 6-8,5 og teststoffets oxygenforbrug er mindre end 60 %, gentages testen med lavere teststofkoncentration.

Se også I.5.2.

Hvis den procentvise nedbrydning af anilin beregnet ud fra oxygenforbrug ikke er større end 40 % efter 7 dage og 65 % efter 14 dage, anses testen for ugyldig.

VII.3.3. **Rapportering**

Se I.8.

VII.4. RESULTATSKEMA

Nedenfor er vist et eksempel på et resultatskema.

MITI (I) TEST

1. **LABORATORIUM**

2. **DATO VED TESTENS BEGYNDELSE**

▼B

3. **TESTSTOF**

Navn:

Stamopløsningens koncentration: … mg/l stof

Begyndelseskoncentration i kolbe, $C_o$: … mg/l stof

Reaktions blandingens volumen, V: … ml

ThOD eller COD: … mg $O_2$/l

4. **INOCULUM**

Lokaliteter for prøveudtagning:

1) … 6) …

2) … 7) …

3) … 8) …

4) … 9) …

5) … 10) …

Koncentration af opslæmmet tørstof i det aktive slam efter akklimatisering med syntetisk spildevand: … mg/l

Rumfang af aktivt slam pr. liter slutmedium: … ml

Slamkoncentration i slutmedium: mg/l

5. **OXYGENOPTAGELSE: BIONEDBRYDEL IGHED**

Respirometertype:

| | | | Tid (dage) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| $O_2$ optag, (mg) teststof | $a_1$ | | | | | | |
| | $a_2$ | | | | | | |
| | $a_3$ | | | | | | |
| $O_2$ optag, (mg) blindprøve | b | | | | | | |
| Korrigeret $O_2$ opt. (mg) | ($a_1$-b)<br>($a_2$-b)<br>($a_3$-b) | | | | | | |
| BOD pr. mg test-stof | $\frac{(a-b)}{C_oV}$ | Kolbe 1 | | | | | |
| | | Kolbe 2 | | | | | |
| | | Kolbe 3 | | | | | |
| % nedbrydning $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$ | | 2 3 | | | | | |
| | | 2 | | | | | |
| | | 3 | | | | | |
| | | gnsn. (*) | | | | | |

(*) Tag ikke gennemsnittet, hvis der er en betydelig forskel mellem replikaterne.

▼B

*Anmærkning*: Der kan anvendes en tilsvarende opstilling for referencekemikaliet og toksicitetskontrolprøverne.

6. **KULSTOFANALYSE (valgfri)**

Kulstofanalysator:

| Kolbe | DOC | | | | % DOC fjernet | Gennemsnit |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Målt | | Korrigeret | | | |
| Vand + teststof | a | | | | | |
| Slam + teststof | $b_1$ | | $b_1$-c | | | |
| Slam + teststof | $b_2$ | | $b_2$-c | | | |
| Slam + teststof | $b_3$ | | $b_3$-c | | | |
| Kontrolblind | c | | — | | — | — |

$$\% \text{ DOC forsvundet}: \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA FRA SPECIFIK KEMISK ANALYSE**

| | Restmængde af teststof ved testens afslutning | % nedbrydning |
|---|---|---|
| blindprøve med vand | $S_b$ | |
| medium med inoculum | $S_{a1}$ | |
| | $S_{a2}$ | |
| | $S_{a3}$ | |

$$\% \text{ nedbrydning} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

% nedbrydning beregnes for kolbe $a_1$, $a_2$ og $a_3$.

8. **BEMÆRKNINGER**

En kurve over BOD mod tiden skal vedlægges, hvis den foreligger.

▼B

*Bilag I*

**FORKORTELSER OG DEFINITIONER**

DO: Opløst oxygen (mg/l) er koncentrationen af opløst oxygen i en vandig prøve.

BOD: Biokemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, som mikroorganismer forbruger under metabolisme af teststoffet; udtrykkes også i g optaget oxygen pr. g teststof (se metode C.6).

COD: Kemisk oxygenforbrug (g) er den mængde oxygen, der forbruges ved oxidation af teststoffet med varm dichromat i sur væske; det er et mål for den tilstedeværende mængde oxiderbart stof; udtrykkes også i g forbrugt oxygen pr. g teststof (se metode C.6).

DOC: Opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 μm filter, eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 40 000 $ms^{-2}$± (4 000 g) i 15 minutter.

ThOD: Teoretisk oxygenforbrug (mg) er den samlede mængde oxygen, der kræves til fuldstændig oxidation af et kemisk stof; det beregnes på grundlag af bruttoformlen (se bilag II, punkt 2) og udtrykkes også i mg oxygen pr. mg teststof.

$ThCO_2$: Teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af teststoffets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af teststoffet; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg teststof.

TOC: En prøves totale indhold af organisk kulstof er summen af organisk kulstof i opløsning og i opslæmning.

IC: Uorganisk kulstof

TC: En prøves totale kulstofindhold er summen af organisk og uorganisk kulstof.

*Primær bionedbrydning:*

er en sådan ændring af et stofs kemiske struktur, fremkaldt ad biologisk vej, at stoffet mister sine specifikke egenskaber.

*Fuldstændig bionedbrydning (aerob):*

er den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et teststof fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, uorganiske salte og nye cellebestanddele (biomasse).

*Let bionedbrydelig:*

kendetegner en arbitrær klasse af kemikalier, der har klaret visse specifikke screeningstest for fuldstændig bionedbrydning; disse test er så krævende, at sådanne stoffer i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

▼B

*Inherent (potentielt) bionedbrydelig:*

karakteriserer en klasse af kemikalier, som ved enhver anerkendt bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

*Behandlingsmulighed:*

er muligheden for at fjerne et stof ved biologisk spildevandsrensning uden at spildevandsrensningsprocessernes normale forløb forstyrres. Generelt er alle let bionedbrydelige, men ikke alle inherent bionedbrydelige, stoffer mulige at behandle. Abiotiske processer kan også spille ind.

*Lag-periode:*

er det tidsrum, der i en elimineringstest forløber fra inokuleringen, indtil nedbrydningsprocenten er mindst 10 %. Lag-perioden er ofte stærkt varierende og vanskeligt reproducerbar.

*Nedbrydnings tid:*

er tidsrummet mellem lagperiodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

*10-dages-vindue:*

er den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

▼B

*Bilag II*

**BEREGNING OG BESTEMMELSE AF PASSENDE HOVEDPARAMETRE**

Der vil afhængigt af den valgte metode være behov for forskellige hovedparametre. I dette afsnit beskrives, hvordan disse værdier udledes. Parametrenes anvendelse er beskrevet i de enkelte metoder.

1. **Kulstofindhold**

Kulstofindholdet kan enten beregnes ud fra teststoffets grundstofsammensætning elier bestemmes ved elementaranalyse.

2. **Teoretisk oxygenforbrug (ThOD)**

Det teoretiske oxygenforbrug (ThOD) kan beregnes, hvis grundstofsammensætningen er kendt, og ellers bestemmes ved elementaranalyse. For forbindelsen:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

er det uden nitrifikation

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ (2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o)}{MW}\ mg/mg$$

og med nitrifikation

$$ThOD_{NO3} = \frac{16(2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2na - o)}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kemisk oxygenforbrug (COD)**

Det kemiske oxygenforbrug (COD) bestemmes efter metode C.6.

4. **Opløst organisk kulstof (DOC)**

Opløst organisk kulstof (DOC) defineres som den organiske kulstofmængde i et kemikalie eller en kemikalie-blanding, som i vandig opløsning kan passere gennem et 0,45 μm filter.

Der udtages prøver fra testbeholderne, som straks filtreres gennem filtreringsudstyret, der er forsynet med et passende membranfilter. De første 20 ml af filtratet bortkastes (ved små filtre kan denne mængde reduceres). Der opsamles en mængde på 10-20 ml til kulstofanalyse (ved indsprøjtning mindre, afhængigt af den anvendte kulstofanalysator). DOC-koncentrationen bestemmes ved hjælp af en organisk kulstofanalysator, som tillader nøjagtig bestemmelse af en kulstofkoncentration på mindre end 10 % af startkoncentrationen af DOC i testen.

Kan filtrerede prøver ikke analyseres samme arbejdsdag, kan de opbevares i højst 48 timer i køleskab ved 2-4 °C eller i længere tid ved – 18 °C.

*Anmærkninger:*

Membranfiltre er ofte behandlet med overfladeaktive stoffer, så de bliver mere hydrofile. De kan derfor indeholde op til flere mg opløseligt organisk kulstof, som vil gribe forstyrrende ind i bionedbrydehghedsbestemmelsen. De overfladeaktive stoffer og andre opløselige organiske stoffer fjernes fra filtrene ved kogning i demineraliseret vand i 3 gange 1 time. Derefter kan filtrene opbevares i vand i op til 1 uge. Benyttes der engangsfiltre, må hvert parti kontrolleres for afgivelse af opløseligt organisk kulstof.

▼B

På visse typer membranfiltre kan der ske adsorption af teststoffet. Det tilrådes derfor at kontrollere, at teststoffet ikke tilbageholdes på filteret.

Centrifugering ved 40 000 $ms^{-2}$ (4 000 g) i 15 minutter kan træde i stedet for filtrering, når der skal skelnes mellem TOC og DOC. Metoden er ikke pålidelig ved en startkoncentration på < 10 mg DOC pr. l, da enten ikke alle bakterier fjernes eller noget af kulstoffet i bakteriernes cytoplasma genopløses.

*BIBLIOGRAFI*


— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed., Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschüß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut fur Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

*Bilag III*

**VURDERING AF TUNGTOPLØSELIGE STOFFERS BIONEDBRYDELIGHED**

Nedenstående forhold kræver særlig opmærksomhed ved test af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

Homogene væsker vil sjældent volde problemer ved prøveudtagningen, hvorimod det anbefales at homogenisere faste materialer på passende måde, således at fejl som følge af inhomogenitet undgås. Der må udvises særlig omhu, når der skal udtages en repræsentativ prøve på nogle få mg af blandinger af kemikalier og af stoffer, der indeholder store mængder urenheder.

Under testen kan der anvendes forskellige former for omrøring. Omrøringen skal blot være så kraftig, at kemikaliet holdes dispergeret, og overophedning, stærk skumning og voldsomme forskydningskræfter skal undgås.

Der kan benyttes en emulgator tii at frembringe en stabil dispersion af kemikaliet. Emulgatoren må ikke være toksisk for bakterier og må hverken kunne bionedbrydes eller vare skumdannende under testbetingelserne.

Der gælder samme kriterier for opløsningsmidler som for emulgatorer.

Det frarådes at benytte faste bærematerialer til faste teststoffer, hvorimod de kan være egnede til olieagtige stoffer.

Når der anvendes hjælpestoffer såsom emulgatorer, opløsningsmidler og bærematerialer, udføres der en blindprøve med hjælpestoffet.

Alle tre respirometertest, $CO_2$, BOD og MITI, kan benyttes til undersøgelse af tungtopløselige stoffers bionedbrydelighed.

*BIBLIOGRAFI*

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly-soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

*Bilag IV*

## VURDERING AF BIONEDBRYDELIGHEDEN AF KEMISKE STOFFER, DER MISTÆNKES FOR AT VÆRE TOKSISKE FOR INOCULUM

Hvis et kemisk stof, som underkastes en test for let bionedbrydelighed, ikke synes at være bionedbrydeligt, tilrådes det at følge nedenstående fremgangsmåde, hvis der ønskes skelnet mellem hæmning og manglende nedbrydelighed (Reynolds et al., 1987).

Der anvendes samme eller tilsvarende inoculum til toksicitetstest som til bionedbrydningstest.

For at kunne vurdere toksiciteten af kemikalier, der undersøges i test for let bionedbrydelighed, kan man anvende en af følgende metoder eller en kombination af dem: Hæmning af slammets respirationshastighed (aktiveret slam — respirationshæmningstest — direktiv 88/302/EØF); BOD og/eller vækstthæmningstest.

Hvis hæmning som følge af toksicitet skal undgås, anbefales det at benytte teststofkoncentrationer i test for let bionedbrydelighed, som er højst 1/10 af de $EC_{50}$-værdier (eller højst de $EC_{20}$-værdicr), der er fundet ved toksicitetstest. Stoffer, hvis $EC_{50}$ er sterre end 300 mg/l, vil næppe have toksiske virkninger i test for let bionedbrydelighed.

En $EC_{50}$ på mindre end 20 mg/l vil sandsynligvis skabe betydelige vanskeligheder for den efterfølgende testning. Testkoncentrationerne skal være lave, hvilket kræver anvendelse af den strenge og følsomme Closed Bottle-test eller af $^{14}C$-mærket materiale. Alternativt kan der ved tilvænning af inoculum blive mulighed for at benytte højere teststofkoncentrationer. I sidstnævnte tilfælde mister testen for let bionedbrydelighed dog sin specifikke karakter.

*BIBLIOGRAFI*

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

*Bilag V*

## KORREKTION AF NITRIFIKATIONENS INTERFERENS PÅ OXYGENOPTAGELSEN

Fejl ved at undlade at tage hensyn til nitrifikation ved vurdering af bionedbrydeligheden af teststoffer, der ikke indeholder N, er minimal (højst 5 %), selv om oxidationen af mediets indhold af ammonium-N svinger vilkårligt fra testprøve til blindprøve. For teststoffer, der indeholder N, kan der imidlertid opstå væsentlige fejl.

Hvis der sker ufuldstændig nitrifikation, kan reaktionsblandingens iagttagne oxygenoptagelse korrigeres for den oxygenmængde, der er medgået til oxidation af ammonium til nitrit og nitrat, hvis ændringerne i nitrit- og nitratkoncentrationen under inkuberingen bestemmes under hensyntagen til følgende reaktionsligninger:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

brutto:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Ud fra ligning (1) bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen i form af ammoniumchlorid ($NH_4Cl$) til nitrit 96 g, dvs. en faktor på 3,43 (96/28). På tilsvarende måde bliver oxygenoptagelsen ved oxidation af 28 g nitrogen til nitrat (3) 128 g, dvs. en faktor på 4,57 (128/28).

Da reaktionerne er sekventielle, idet de finder sted p.g.a. hver deres bakteriearter, kan nitritkoncentrationen stige eller falde; i sidstnævnte tilfælde vil der blive dannet en ækvivalent mængde nitrat. Derfor bliver oxygenforbruget ved nitratdannelsen 4,57 gange forøgelsen i nitratkoncentrationen, hvorimod den oxygenmængde, der er involveret i nitritdannelsen, er 3,43 gange forøgelsen i nitritkoncentrationen, eller ved et fald i nitritkoncentrationen, et oxygentab på —3,43 gange koncentrationsfaldet.

Det vil sige, at

$O_2$-forbrug ved nitratdannelse = 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (4)

og

$O_2$-forbrug ved nitritdannelse = 3,43 × N-nitritkoncentrationsforøgelsen (5)

og

$O_2$-tab ved nitritomdannelse = – 3,43 × N-nitratkoncentrationsfaldet (6)

Derved bliver

$O_2$-forbrug til nitrifikation = ± 3,43 × N-nitritkoncentrationsændringen + 4,57 × N-nitratkoncentrationsforøgelsen (7)

og dermed

$O_2$-forbrug til C-oxidation = samlet iagttaget forbrug — forbrug til nitrifikation (8).

Alternativt kan oxygenoptagelsen som følge af nitrifikation som en første tilnærmelse sættes til 4,57 × tilvæksten i oxideret N, hvis kun total oxyderet N bestemmes.

Den korrigerede værdi for oxygenforbruget til C-oxidation sammenlignes dernæst med $ThOD_{NH4}$ beregnet efter bilag II.

▼B

C.5. **NEDBRYDNING — BIOKEMISK OXYGENFORBRUG**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med metoden er måling af det biokemiske oxygenforbrug (BOD) for faste eller flydende organiske stoffer.

Data, som opnås med denne test, vedrører vandopløselige stoffer; dog kan, i det mindste i princippet, flygtige stoffer samt stoffer med lav vandopløselighed også testes.

Denne metode kan kun anvendes på organiske testmaterialer, der ikke virker hæmmende for bakterier ved den koncentration, som anvendes ved testen. Hvis testmaterialet ikke lader sig opløse ved testkoncentrationen, kan det være nødvendigt at anvende særlige foranstaltninger, såsom ultralyddispersion for at opnå god dispersion af testmaterialet.

Oplysninger om kemikaliets toksicitet kan være nyttige for fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

BOD defineres som den mængde opløst oxygen, der kræves til biokemisk oxidation af en nærmere angivet mængde opløsning af stoffet under foreskrevne betingelser.

Resultatet udtrykkes som g BOD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Brug af et egnet referencestof til kontrol af inoculums aktivitet er ønskelig.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde stof, opløst eller dispergeret i et egnet og godt gennemluftet medium, podes med mikroorganismer og inkuberes ved konstant kendt temperatur i mørke.

BOD bestemmes som forskellen mellem indholdet af opløst oxygen ved forsøgets begyndelse og ved forsøgets afslutning. Forsøgets varighed skal være mindst fem dage og ikke over 28 dage.

Der udføres parallelt en blindprøve uden indhold af reststof.

1.5. KVALITETSKRITERIER

En BOD-bestemmelse kan ikke betragtes som en gyldig bestemmelse af et stofs bionedbrydelighed, men kun som en screeningtest.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

En foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet fremstilles for at opnå en BOD-koncentration, som er forenelig med den anvendte metode. BOD bestemmes derpå efter en hvilken som helst egnet national eller international standardmetode.

▼B

2. **DATA OG EVALUERING**

BOD-indholdet i opløsningen beregnes efter den valgte standardmetode og omregnes til g BOD pr. g stof.

3. **RAPPORTERING**

Den anvendte metode skal anføres.

Det biokemiske oxygenforbrug skal være gennemsnittet af mindst tre gyldige målinger.

Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder, fysiske tilstand og toksiske virkninger, som vil kunne påvirke resultaterne.

Eventuel brug af tilsætningsstof til at hindre biologisk nitrifikation skal rapporteres.

4. HENVISNINGER

Liste over standardiserede metoder, f.eks.

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **NEDBRYDNING — KEMISK OXYGENFORBRUG**

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at måle det kemiske oxygenforbrug (COD) for faste og flydende organiske stoffer på en vilkårlig standardiseret måde under bestemte laboratoriebetingelser.

Oplysninger om stoffets formel vil være nyttige ved gennemførelse af testen og for fortolkningen af de opnåede resultater (f.eks. halogensalte, organiske jern(II)salte, organiske chlorforbindelser).

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Det kemiske oxygenforbrug er et mål for et stofs evne til at kunne oxideres, og det udtrykkes som den ækvivalente mængde oxygen i det oxiderende reagens, der forbruges af stoffet under bestemte laboratoriebetingelser.

Resultatet udtrykkes som g COD pr. g undersøgt stof.

1.3. REFERENCESTOFFER

Anvendelse af referencestoffer er ikke påkrævet, hver gang et nyt stof skal undersøges. Referencestoffer skal først og fremmest tjene til lejlighedsvis kalibrering af metoden og til sammenligning med resultater opnået med andre metoder.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

En afmålt mængde af stoffet, opløst eller dispergeret i vand, oxideres med kaliumdichromat i stærkt svovlsur opløsning med sølvsulfat som katalysator under tilbagesvaling i to timer. Den uforbrugte mængde dichromat bestemmes ved titrering med en standardopløsning af ferroammoniumsulfat.

I tilfælde af chlorholdige stoffer tilsættes mercurisulfat ([1]) for at nedsætte interferens fra chlorid.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Da metoden har en vis vilkårlig karakter, må COD betragtes som en »oxiderbarhedsindikator«, der er et praktisk mål for indholdet af organisk stof.

Chlorid kan forstyrre målingen; også uorganiske reducerende eller oxiderende stoffer kan forstyrre COD-bestemmelsen.

Visse cykliske forbindelser og mange flygtige stoffer (f.eks. lavere fedtsyrer) oxideres ikke fuldstændigt ved denne metode.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

Der fremstilles en foreløbig opløsning eller dispersion af stoffet, således at der opnås en COD-værdi mellem 250 og 600 mg pr. liter.

([1]) Brugte opløsninger, der indeholder mercurisalte, behandles således, at der ikke spredes kviksølv: i miljøet.

▼B

*Bemærkning:*

I tilfælde af vanskeligt opløselige og ikke dispergerbare stoffer kan der afvejes en mængde fint pulveriseret eller væskeformigt stof svarende til ca. 5 mg COD, som overføres til forsøgsopstillingen med vand.

Det kemiske oxygenforbrug kan ofte, og især for stoffer med ringe opløselighed, med fordel bestemmes med en variant af metoden, nemlig et lukket system med trykudligning (H. Kelkenberg, 1975). Med denne modifikation kan der ofte med held foretages kvantitativ bestemmelse af forbindelser, der kun vanskeligt kan bestemmes ved konventionelle metoder, f.eks. eddikesyre. Metoden duer dog ikke til pyridin. Forøgelse af kaliumdichromatkoncentrationen til 0,25 N (0,0416 M) som anført i henvisning (1) kan lette den direkte afvejning af 5-10 mg stof, hvilket er en betingelse for COD-bestemmelse på stoffer med ringe vandopløselighed (henvisning (2)).

I øvrigt bestemmes COD derefter ved hjælp af en egnet national eller international standardmetode.

## 2. DATA OG EVALUERING

COD-indholdet i forsøgskolben beregnes i henhold til den valgte standardmetode og omregnes til g COD pr. g teststof.

## 3. RAPPORTERING

Den anvendte referencemetode skal anføres.

Det kemiske oxygenforbrug skal være et gennemsnit af mindst tre målinger. Alle oplysninger og bemærkninger af betydning for fortolkningen af resultaterne skal rapporteres, navnlig med hensyn til stoffets egen sammensætning, urenheder og fysiske tilstand (hvis de kendes), som vil kunne påvirke resultaterne.

Anvendelse af mercurisulfat til formindskelse af interferens fra chlorid skal rapporteres.

## 4. HENVISNINGER

(1) Kelkenberg, H. Z, von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Liste over standardiserede metoder, f.eks.:

NBN T 91-201: Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN 0 11 7512494: Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101: Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis: Determination of the chemical oxygen: demand.

DIN 38409-H-41: Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. **NEDBRYDNING — ABIOTISK NEDBRYDNING: HYDROLYSE SOM FUNKTION AF pH**

1. **METODE**

Denne testmetode er ækvivalent med OECD TG 111 (2004).

1.1. INDLEDNING

Kemiske stoffer kan tilføres overfladevande ved direkte udledning, vinddrift, afstrømning, afvanding, affaldsbortskaffelse, udledning fra industri, husholdninger eller landbrug samt ved afsætning fra atmosfæren og kan i sådanne vande omdannes ved kemiske (f.eks. hydrolyse, oxidation), fotokemiske og/eller mikrobielle processer. I denne vejledning beskrives en laboratoriemetode til vurdering af abiotisk hydrolytisk omdannelse af kemiske stoffer i akvatiske systemer ved de i miljøet normalt forekommende pH-værdier (pH 4-9), baseret på eksisterende guidelines (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Formålet med forsøgene er at bestemme i) hydrolysehastigheden af prøvestoffet som funktion af pH og ii) identitet eller art af samt dannelses- og nedbrydningshastighed for hydrolyseprodukter, som organismer kan blive udsat for. Sådanne undersøgelser kan være påkrævede for kemiske stoffer, der direkte tilføres vand eller må forventes at nå miljøet ad de andre veje beskrevet ovenfor.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Se bilag 2.

1.3. METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

Metoden finder anvendelse på alle kemiske stoffer (umærkede eller mærkede), for hvilke der foreligger en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Den finder anvendelse på tungtflygtige og ikke-flygtige forbindelser med tilstrækkelig vandopløselighed. Metoden bør ikke anvendes på stoffer, der er letflygtige fra vand (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke kan holdes i opløsning under de her beskrevne forsøgsbetingelser. Den kan være vanskelig at anvende på stoffer med meget ringe vandopløselighed (8).

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Sterile vandige bufferopløsninger med forskellige pH-værdier (pH 4, 7 og 9) behandles med prøvestoffet og inkuberes i mørke under kontrollerede laboratoriebetingelser (ved konstant temperatur). Efter passende tidsintervaller analyseres bufferopløsningerne for prøvestoffet og for hydrolyseprodukter. Anvendelse af mærket prøvestof (f.eks. $^{14}C$) letter opstilling af en massebalance.

I metoden anvendes en trinvis fremgangsmåde som illustreret og forklaret i bilag 1. Hvert trin udløses af resultaterne af det foregående trin.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af hydrolysehastighed kan anvendes umærket eller mærket prøvestof. Til undersøgelse af hydrolysevejen og opstilling af massebalance er mærket stof sædvanligvis at foretrække; i særlige tilfælde er mærkning dog ikke absolut nødvendig. $^{14}C$-mærkning anbefales, men andre isotoper, såsom $^{13}C$, $^{15}N$ eller $^{3}H$, kan ligeledes være nyttige. Mærket bør så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e). Indeholder prøvestoffet således én ring, skal denne ring være mærket; indeholder stoffet to eller flere ringe, kan det være nødvendigt med separate undersøgelser til fastlæggelse af skæbnen af hver mærket ring og til at skaffe tilstrækkelige oplysninger om dannelsen af hydrolyseprodukter. Prøvestoffets renhed skal være mindst 95 %.

Før udførelse af et hydrolyseforsøg bør følgende oplysninger om prøvestoffet foreligge:

a) vandopløselighed (testmetode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (testmetode A.4) og/eller Henrys lovkonstant

d) fordelingskoefficient n-oktanol/vand (testmetode A.8)

e) dissociationskonstant ($pK_a$) (OECD Guideline 112) (9)

f) når det er hensigtsmæssigt, direkte og indirekte fototransformationshastighed i vand.

Der bør foreligge analysemetoder til kvantitativ bestemmelse afprøvestoffet og, hvis relevant, identifikation og kvantitativ bestemmelse af hydrolyseprodukter i vandige opløsninger (se også punkt 1.7.2).

1.6. REFERENCESTOFFER

Når det er muligt, bør der anvendes referencestoffer til identifikation og kvantitativ bestemmelse af hydrolyseprodukter ved spektroskopiske og kromatografiske metoder eller andre metoder med tilstrækkelig følsomhed.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfinding**

Analyse af mindst dobbelte bufferopløsninger eller af ekstrakter deraf efter tilsætning af prøvestoffet giver et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om ensartetheden af tilsætningen af prøvestoffet. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer (når mærket stof anvendes). Genfindingen bør være mellem 90 % og 110 % for mærkede og umærkede kemiske stoffer (7). Hvis det er teknisk vanskeligt at nå dette område, er en genfindingsgrad på 70 % for umærkede kemiske stoffer acceptabel, men skal begrundes.

▼B

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af de(n) analysemetode(r), der senere anvendes til kvantificering af prøvestoffet og hydrolyseprodukter, kan kontrolleres ved dobbeltanalyse af de samme bufferopløsninger (eller af ekstrakter deraf), efter at der er dannet en tilstrækkelig mængde hydrolyseprodukter til kvantitativ bestemmelse.

Analysemetoden skal være tilstrækkelig følsom til at kvantificere prøvestofkoncentrationer ned til 10 % eller derunder af begyndelseskoncentrationen. Hvis det er relevant, skal analysemetoderne desuden være tilstrækkelig følsomme til kvantificering af eventuelle hydrolyseprodukter, der udgør 10 % eller mere af den tilsatte mængde (til et vilkårligt tidspunkt under undersøgelsen) ned til 25 % eller derunder af deres spidskoncentration.

1.7.3. **Konfidensintervaller for hydrolysekinetikdata**

Der beregnes og angives konfidensintervaller for alle regressionskoefficienter, hastighedskonstanter, halveringstider og eventuelle andre kinetikparametre (f.eks. $DT_{50}$).

1.8. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.8.1. **Udstyr og apparatur**

Undersøgelsen udføres i glasbeholdere (f.eks. reagensglas eller små kolber), om nødvendigt i mørke og under sterile betingelser, medmindre foreløbige oplysninger (som f.eks. n-oktanol-vand fordelingskoefficienten) viser, at prøvestoffet kan adhærere til glas. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at overveje alternative materialer (som f.eks. Teflon). Problemet med adhæsion til glas kan desuden løses ved en eller flere af følgende metoder:

— bestemmelse af den masse prøvestof og hydrolyseprodukter, der er sorberet til prøvebeholderen

— anvendelse af ultralydsbad

— vask af alt glasapparatur i opløsningsmiddel ved hvert prøvetagningsinterval

— anvendelse af færdigformuleret produkt

— anvendelse af ekstra hjælpefortynder ved tilsætning af prøvestof til systemet; som hjælpefortynder må undgås stoffer der hydrolyserer prøvestoffet.

Til inkubering af de forskellige prøveopløsninger skal normalt anvendes temperaturstyrede vandbade eller termostaterede inkubatorer.

Sædvanligt laboratorieudstyr skal være til rådighed, herunder specielt følgende:

— pH-meter

▼B

— analyseapparatur som f.eks. GC, HPLC og TLC med passende detektionssystem til analyse af radioaktivt mærkede eller umærkede stoffer eller til omvendt isotopfortyndingsmetode

— instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, mv.)

— væskescintillationstæller

— skilletragte til væske-væske ekstraktion

— udstyr til koncentrering af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper)

— temperaturreguleringsanordning (f.eks. vandbad).

Kemiske reagenser, f.eks. følgende:

— organiske opløsningsmidler af analysekvalitet, således hexan, dichlormethan mv.

— scintillationsvæske

— bufferopløsninger (som nærmere angivet i pkt. 1.8.3).

Alt glasudstyr, vand af analysekvalitet og bufferopløsninger, som anvendes i hydrolyseforsøgene, skal være steriliseret.

1.8.2. **Tilsætning af prøvestoffet**

Prøvestoffet tilsættes som vandig opløsning til de forskellige bufferopløsninger (se bilag 3). Om nødvendigt kan man for at få opløst tilstrækkeligt af stoffet tilsætte lidt vandopløseligt opløsningsmiddel (f.eks. acetonitril, acetone, ethanol) når prøvestoffet tilsættes og fordeles, men normalt ikke i større mængde end 1 % v/v. Anvendelse af opløsningsmidler i højere koncentration (f.eks. til tungtopløselige prøvestoffer) er kun tilladt, hvis det godtgøres at opløsningsmidlet er uden indflydelse på hydrolysen afprøvestoffet.

Rutinemæssig brug af formuleret produkt kan ikke anbefales, da det ikke kan udelukkes at hjælpestoffer i formuleringen vil påvirke hydrolyseprocessen. For prøvestoffer der er tungtopløselige i vand, og for stoffer der adhærerer til glas (se 1.8.1) kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

Prøvestoffet bør anvendes i én koncentration, der ikke bør være over 0,01 M eller det halve af mætningskoncentrationen (se bilag 1).

▼B

1.8.3. **Bufferopløsninger**

Hydrolyseforsøget udføres ved pH 4, 7 og 9. Vand og kemikalier anvendt til fremstilling af sådanne bufferopløsninger skal være af analysekvalitet. I bilag 3 beskrives nogle nyttige buffersystemer. Man må være opmærksom på, at det anvendte buffersystem kan influere på hydrolysehastigheden, og er dette tilfældet, må der vælges et andet buffersystem ([1]).

pH af hver bufferopløsning skal kontrolleres med et kalibreret pH-meter med en nøjagtighed på mindst 0,1 ved den foreskrevne temperatur.

1.8.4. **Forsøgsbetingelser**

1.8.4.1. *Forsøgstemperatur*

Hydrolyseforsøgene skal udføres ved konstant temperatur. Til brug ved ekstrapolation er det vigtigt, at temperaturen holdes konstant inden for ± 0,5 °C.

Der bør udføres et indledende forsøg (trin 1) ved en temperatur på 50 °C, hvis prøvestoffets hydrolyseegenskaber er ukendte. Kinetiske forsøg på efterfølgende trin udføres ved mindst tre temperaturer (herunder forsøget ved 50 °C), medmindre prøvestoffet ved trin 1-forsøget er fundet stabilt over for hydrolyse. Det foreslås at anvende et temperaturområde på 10-70 °C (idet mindst én temperatur bør være under 25 °C), der således dækker rapporteringstemperaturen på 25 °C og størstedelen af det temperaturområde, der forekommer i marken.

1.8.4.2. *Lys og oxygen*

Alle hydrolyseforsøg skal udføres med en metode, der bevirker at fotolytiske effekter undgås. Der skal træffes alle nødvendige forholdsregler til undgåelse af oxygen (f.eks. ved gennembobling med helium, nitrogen eller argon i 5 minutter, før opløsningen fremstilles).

1.8.4.3. *Forsøgets varighed*

Forprøven strækker sig over 5 døgn, hvorimod de efterfølgende forsøg fortsætter indtil prøvestoffet er 90 % hydrolyseret, dog højst 30 døgn.

1.8.5. **Forsøgets udførelse**

1.8.5.1. *Forprøve (trin 1)*

Forprøven udføres ved 50 ± 0,5 °C og pH 4,0, 7,0 og 9,0. Iagttages mindre end 10 % hydrolyse efter 5 døgn ($t_{0,5}$25 °C > 1 år), anses prøvestoffet for hydrolytisk stabilt, og yderligere forsøg kræves normalt ikke. Vides stoffet at være ustabilt ved miljømæssigt relevante temperaturer ([2]), er forprøve unødvendig. Analysemetoden skal være tilstrækkelig præcis og følsom til at påvise en reduktion på 10 % af begyndelseskoncentrationen.

([1]) Mabey og Mill anbefaler brug af borat- eller acetatbuffer i stedet for fosfat (11).

([2]) Sådanne oplysninger kan komme fra andre kilder, således hydrolysedata for strukturelt beslægtede forbindelser, fra litteraturen eller fra andre semikvantitative forprøver med hydrolyse af prøvestoffet i en tidligere udviklingsfase.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolyse af ustabile stoffer (trin 2)*

Forsøget på næste trin (avanceret) udføres ved de pH-værdier, hvor prøvestoffet i ovennævnte forprøve er fundet ustabilt. De bufrede opløsninger af prøvestof termostateres ved de valgte temperaturer. Med henblik på fastlæggelse af førsteordens-kinetik analyseres hver reaktionsopløsning med tidsintervaller svarende til mindst seks adskilte datapunkter, normalt svarende til mellem 10 % og 90 % hydrolyse af prøvestoffet. De enkelte gentagelsesprøver (mindst dobbeltprøver, der opbevares i separate reaktionsbeholdere) udtages, og indholdet analyseres på hvert af mindst seks prøvetagningstidspunkter (svarende til mindst tolv datapunkter med gentagelser). Det anses for uhensigtsmæssigt at anvende en enkelt bulkprøve og heraf udtage de enkelte aliquoter af prøveopløsningen på hvert prøvetagningstidspunkt, da der derved ikke tages hensyn til analysevariationen, og da kontamination af prøveopløsningen kan være et problem. Sterilitetskontrol udføres ved afslutningen af det efterfølgende trin (dvs. ved 90 % hydrolyse eller efter 30 døgn). Iagttages ingen nedbrydning (dvs. omdannelse), anses sterilitskontrol dog for unødvendig.

1.8.5.3. *Identifikation af hydrolyseprodukter (trin 3)*

De vigtigste hydrolyseprodukter, i det mindste dem, der udgør > 10 % af den tilførte dosis, identificeres med egnede analysemetoder.

1.8.5.4. *Ikke-obligatoriske forsøg*

For hydrolytisk ustabile prøvestoffer kan supplerende forsøg ved andre pH-værdier end 4, 7 og 9 være nødvendige. Det kan således være nødvendigt at foretage et forsøg ved større surhedsgrad (f.eks. pH 1,2) ved en enkelt fysiologisk relevant temperatur (37 ºC).

2. **DATA**

Mængden af prøvestof og af eventuelle hydrolyseprodukter angives i % af den anvendte begyndelseskoncentration og, når det er hensigtsmæssigt, i mg/l for hvert prøvetagningsinterval og for hver pH-værdi og forsøgstemperatur. Anvendes mærket prøvestof, skal der desuden opstilles en massebalance, angivet i procent af den anvendte begyndelseskoncentration.

De logaritmisk transformerede prøvestofkoncentrationsdata afbildes grafisk som funktion af tiden. Alle vigtige hydrolyseprodukter, i det mindste dem der udgør ≥ 10 % af den anvendte dosis, identificeres, og deres logaritmisk transformerede koncentration afsættes som for moderstoffet til påvisning af deres dannelses- og nedbrydningshastighed.

▼B

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Der skal foretages en nøjagtigere bestemmelse af halveringstider eller $DT_{50}$-værdier ved passende kinetiske modelberegninger. For hvert pH og hver temperatur angives halveringstid og/eller $DT_{50}$ (med konfidensinterval) sammen med en beskrivelse af den anvendte model, den kinetiske orden og determinationskoefficienten ($r^2$). Samme beregninger foretages desuden for hydrolyseprodukterne, når det er relevant.

For kinetikforsøg udført ved forskellige temperaturer angives hastighedskonstanterne for hydrolysen svarende til en pseudoførsteordensreaktion ($k_{obs}$) som funktion af temperaturen. Beregningen baseres på opdeling af $k_{obs}$ i hastighedskonstanter for syrekatalyseret, neutral og basekatalyseret hydrolyse (hhv. $k_H$, $k_{neutral}$ og $k_{Oh}$) og på Arrheniusligningen:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

hvor $A_i$ og $B_i$ er regressionskonstanterne beregnet af hhv. akseafskæring og hældning af de bedst tilnærmede linjer, der genereres ved lineær regression af ln $k_i$ mod den reciprokke absolutte temperatur i kelvin (T). Ved at anvende Arrhenius-relationen på sur, neutral og basekatalyseret hydrolyse kan pseudoførsteordens hastighedskonstanter og dermed halveringstider beregnes for andre temperaturer, for hvilke det ikke er praktisk muligt at bestemme hastighedskonstanten direkte eksperimentelt (10).

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

De fleste hydrolysereaktioner følger en tilsyneladende førsteordens kinetik, hvorfor halveringstiden er koncentrationsuafhængig (jf. ligning 4 i bilag 2). Derfor kan laboratorieresultater opnået i området $10^{-2}$ til $10^{-3}$ M sædvanligvis anvendes på virkelige forhold ($10^{-6}$ M) (10). Mabey og Mill (11) har rapporteret om flere eksempler på god overensstemmelse mellem hydrolysehastigheder målt i rent vand og råvand for forskellige kemiske stoffer, forudsat at pH og temperatur måles.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

Teststof:

— trivialnavn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af mærkets placering, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysiske/kemiske egenskaber (se punkt 1.5)

— renhed (urenheder) afprøvestoffet

— for mærkede stoffer, renhed af radioaktiv mærkning samt molær aktivitet (hvis relevant).

▼B

— Bufferopløsninger:

— fremstillingsdato og nærmere oplysninger om fremstillingen

— anvendte buffere og vand

— bufferopløsningernes molaritet og pH.

Forsøgsbetingelser:

— dato for forsøgenes udførelse

— anvendt mængde prøvestof

— tilsætning afprøvestoffet: fremgangsmåde og anvendte opløsningsmidler (type og mængde)

— volumen bufret prøvestofopløsning, som er inkuberet

— beskrivelse af det anvendte inkubationssystem

— pH og temperatur under forsøget

— prøvetagningstidspunkter

— ekstraktionsmetode(r)

— metoder til kvantitativ bestemmelse og identifikation afprøvestoffet og dets hydrolyseprodukter i bufferopløsningerne

— antal gentagelser af bestemmelsen.

Resultater:

— de anvendte analysemetoders repeterbarhed og følsomhed

— genfinding (procentangivelser for en gyldig undersøgelse er givet i punkt 1.7.1)

— resultater af gentagne bestemmelser og gennemsnitsværdier, opstillet i tabel

— ved anvendelse afmærket prøvestof, massebalance før, under og efter forsøgene

— resultater af forprøven

— diskussion og fortolkning af resultaterne

— alle oprindelige data og talværdier.

Følgende oplysninger er kun nødvendige, når hydrolysehastigheden bestemmes:

— koncentrationstidskurver over prøvestof og relevante hydrolyseprodukter, for hver pH-værdi og temperatur

— tabeller over beregningsresultater baseret på Arrhenius-ligningen for temperaturen 20 °C/25 °C, sammen med pH, hastighedskonstant ($h^{-1}$ eller $døgn^{-1}$), halveringstid eller $DT_{50}$, temperatur ( °C) herunder konfidensintervaller og korrelationskoefficienter ($r^2$), eller tilsvarende oplysninger

— formodet hydrolysevej.

▼B

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, vedtaget 12. maj 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 ºC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Den Europæiske Union (EU) (1995). Kommissionens direktiv 95/36/EF om ændring af Rådets direktiv 91/414/EØF om markedsføring af plantebeskyttelsesmidler. Bilag V: Skæbne og opførsel i miljøet.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (oktober 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch (red.).

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 — 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

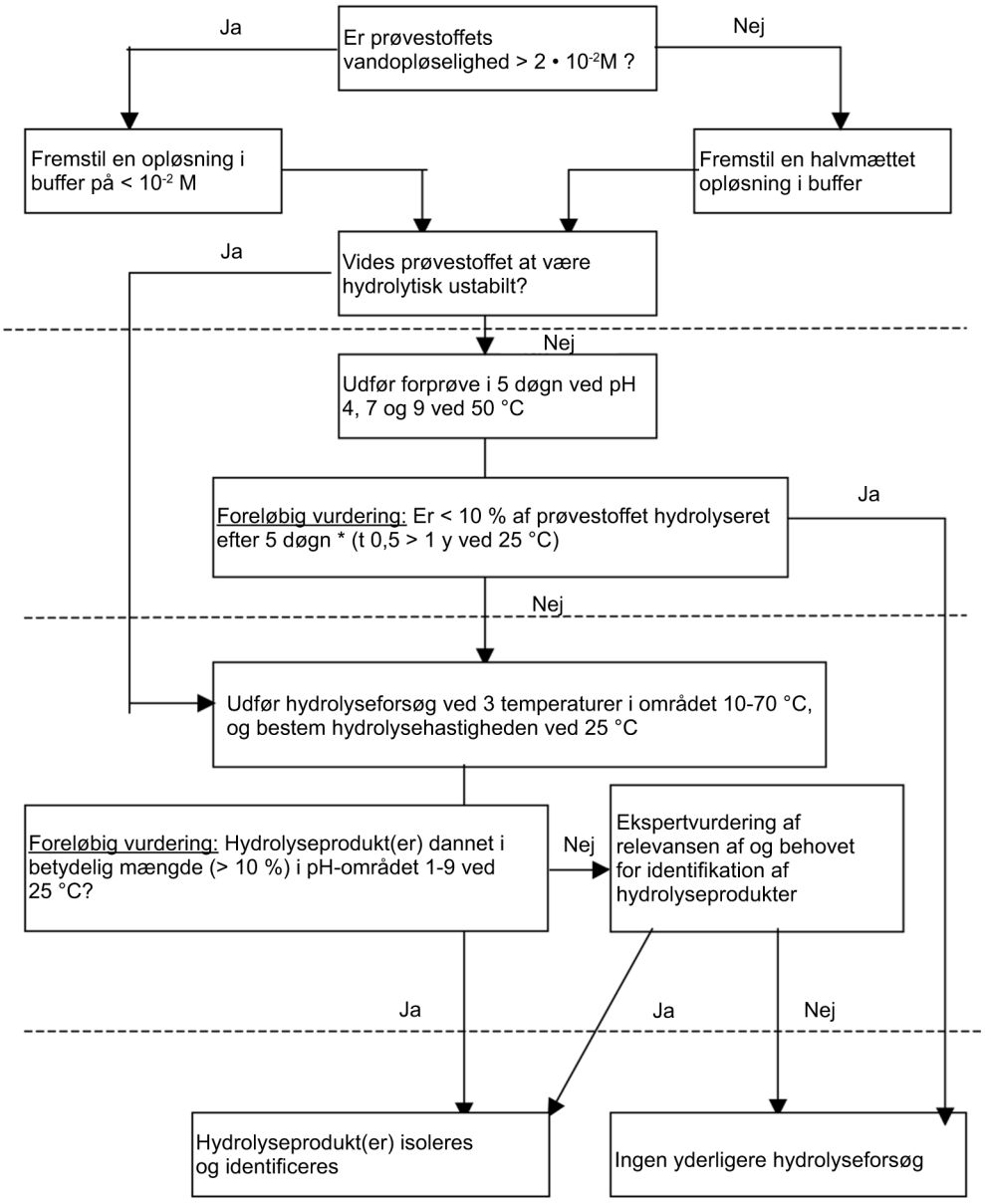
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Skriftlig version af mundtlig præsentation ved 14. årsmøde i Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, november 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

*Bilag 1*

**Trinvis forsøgsplan for hydrolyse**




* 10 % hydrolyse af et prøvestof ved 50 °C svarer til en halveringstid på ca. 30 døgn eller ca. 1 år ved 25 °C.

▼B

*Bilag 2*

**Definitioner og enheder**

**SI-enheder** skal anvendes i alle tilfælde.

**Teststof:** ethvert stof, hvad enten det er moderstoffet eller relevante omdannelsesprodukter.

**Omdannelsesprodukter:** alle stoffer hidrørende fra biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffet.

**Hydrolyseprodukter:** alle stoffer hidrørende fra hydrolytisk omdannelse af prøvestoffet.

Ved **hydrolyse** forstås reaktionen af et prøvestof RX med vand, resulterende i nettoudskiftning af gruppen X med OH på reaktions stedet:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

I denne forenklede proces er den hastighed, hvormed koncentrationen af RX aftager, givet ved

hastighed = $k\ [H_2O]\ [RX]$ andenordens reaktion

eller

hastighed = $k\ [RX]$ førsteordens reaktion

afhængigt af det hastighedsbestemmende trin. Da vand er til stede i stort overskud i forhold til prøvestoffet, beskrives denne type reaktion sædvanligvis som en pseudoførsteordens reaktion, hvor den iagttagne hastighedskonstant er givet ved relationen

$$k_{obs} = k[H_2O] \qquad [2]$$

og kan bestemmes af udtrykket ([1])

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

hvor

t = tiden

og $C_o$, $C_t$ = koncentration af RX til tiden 0 og t.

Denne konstant har dimensionen $(tid)^{-1}$, og halveringstiden for reaktionen (den tid, det tager, før 50 % af RX har reageret) er givet ved

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

**Halveringstid:** ($t_{0,5}$) er den tid, der går, før 50 % prøvestoffet er hydrolyseret, når reaktionen kan beskrives ved førsteordens kinetik; den er uafhængig af koncentrationen.

([1]) Hvis kurven over logaritmisk transformerede data som funktion af tiden ikke peger på en lineær funktion (svarende til en førsteordens reaktion), kan hastighedskonstanten for hydrolyse af prøvestoffet ikke bestemmes af ligning [3].

▼B

**$DT_{50}$ (Disappearance Time 50):** er den tid, i løbet af hvilken koncentrationen afprøvestoffet mindskes med 50 %; den er forskellig fra halveringstiden $t_{0,5}$, når reaktionen ikke følger førsteordens kinetik.

**Skønsmæssig beregning af k ved forskellige temperaturer**

Når hastighedskonstanterne kendes for to temperaturer, kan hastighedskonstanterne for andre temperaturer beregnes ved hjælp af Arrhenius-ligningen:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ eller } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Ved afbildning af ln k mod 1/T fås en ret linje med hældning –E/R,

hvor:

k = hastighedskonstanten, målt ved forskellige temperaturer

E = aktiveringsenergi (kJ/mol)

T = absolut temperatur (K)

R = gaskonstanten (8,314 J/mol.K)

Aktiveringsenergien er beregnet ved regressionsanalyse eller af følgende udtryk:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

hvor: $T_2 > T_1$.

▼B

*Bilag 3*

**Buffersystemer**

A. **CLARK OG LUBS:**

**Bufferblandinger efter CLARK og LUBS** ([1])

| Sammensætning | pH |
|---|---|
| **0,2 N HCl og 0,2 N KCl ved 20 ºC** | |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 1,8 |
| 5,3 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl fortyndet til 100 ml | 2,2 |
| **0,1 M kaliumbiphthalat + 0,1 N HCl ved 20 ºC** | |
| 46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 2,2 |
| 39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 2,4 |
| 32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 2,6 |
| 26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 2,8 |
| 20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 3,0 |
| 14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 3,2 |
| 9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 3,4 |
| 5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 3,6 |
| 2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biphthalat til 100 ml | 3,8 |
| **0,1 M kaliumbiphthalat + 0,1 N NaOH ved 20 ºC** | |
| 0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 4,2 |
| 7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 4,4 |
| 12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 4,6 |
| 17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 4,8 |

([1]) De i tabellerne angivne pH-værdier er beregnet af potentialemålinger ved hjælp af Sørensens standardligninger (1909). De tilsvarende pH-værdier er 0,04 enhed højere end værdierne i tabellerne.

▼B

| Sammensætning | pH |
|---|---|
| 23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biphthalat til 100 ml | 6,0 |

**Bufferblandinger efter CLARK og LUBS (fortsat)**

| **0,1 M monokaliumphosphat +0,1 N NaOH ved 20 ºC** | |
|---|---|
| 5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 6,0 |
| 8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 6,2 |
| 12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 6,4 |
| 17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 6,6 |
| 23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 7,2 |
| 39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 7,4 |
| 42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 7,6 |
| 45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 7,8 |
| 46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml phosphat til 100 ml | 8,0 |
| **0,1 M $H_3B0_3$ i 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH ved 20 ºC** | |
| 2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 7,8 |
| 3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 8,0 |
| 5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 8,2 |
| 8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 8,4 |
| 12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 8,6 |
| 16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 9,2 |

▼B

| | |
|---|---|
| 32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 9,4 |
| 36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 9,6 |
| 40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 9,8 |
| 43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsyre til 100 ml | 10,0 |

B. **KOLTHOFF OG VLEESCHHOUWER:**

**Citratbuffere efter KOLTHOFF og VLEESCHHOUWER**

| Sammensætning | pH |
|---|---|
| **0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N HCl ved 18 ºC** (*) | |
| 49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 2,2 |
| 43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 2,4 |
| 36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 2,6 |
| 30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 2,8 |
| 23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 3,0 |
| 17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 3,2 |
| 10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 3,4 |
| 4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrat til 100 ml | 3,6 |
| **0,1 M monokaliumcitrat og 0,1 N NaOH ved 18 ºC** (*) | |
| 2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 4,2 |
| 23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 4,4 |
| 31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 4,6 |
| 39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 4,8 |
| 46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 5,0 |
| 54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 5,2 |
| 61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 5,4 |
| 68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 5,6 |
| 74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 5,8 |
| 81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrat til 100 ml | 6,0 |

(*) For at undgå skimmelvækst tilsættes en lille krystal thymol eller tilsvarende.

▼B

C. **SØRENSEN:**

**Boratblandinger efter SØRENSEN**

| Sammensætning | | Sørensen 18 °C | Walbum, pH ved | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ml Borax | ml HCl/NaOH | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| **0,05 M borax + 0,1 N HCl** | | | | | |
| 5,25 | 4,75 | 7,62 | 7,64 | 7,55 | 7,47 |
| 5,50 | 4,50 | 7,94 | 7,98 | 7,86 | 7,76 |
| 5,75 | 4,25 | 8,14 | 8,17 | 8,06 | 7,95 |
| 6,00 | 4,00 | 8,29 | 8,32 | 8,19 | 8,08 |
| 6,50 | 3,50 | 8,51 | 8,54 | 8,40 | 8,28 |
| 7,00 | 3,00 | 8,08 | 8,72 | 8,56 | 8,40 |
| 7,50 | 2,50 | 8,80 | 8,84 | 8,67 | 8,50 |
| 8,00 | 2,00 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| 8,50 | 1,50 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| 9,00 | 1,00 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| 9,50 | 0,50 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| 10,00 | 0,00 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| **0,05 M borax + 0,1 N NaOH** | | | | | |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 9,0 | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| 8,0 | 2,0 | 9,50 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| 7,0 | 3,0 | 9,68 | 9,76 | 9,44 | 9,12 |
| 6,0 | 4,0 | 9,97 | 10,06 | 9,67 | 9,28 |

**Phosphatblandinger efter SØRENSEN**

| Sammensætning | pH |
|---|---|
| **0,0667 M monokaliumphosphat + 0,0667 M dinatriumphosphat ved 20 °C** | |
| 99,2 ml $KH_2PO_4$ + 0,8 ml $Na_2HPO_4$ | 5,0 |
| 98,4 ml $KH_2PO_4$ + 1,6 ml $Na_2HPO_4$ | 5,2 |
| 97,3 ml $KH_2PO_4$ + 2,7 ml $Na_2HPO_4$ | 5,4 |
| 95,5 ml $KH_2PO_4$ + 4,5 ml $Na_2HPO_4$ | 5,6 |
| 92,8 ml $KH_2PO_4$ + 7,2 ml $Na_2HPO_4$ | 5,8 |
| 88,9 ml $KH_2PO_4$ + 11,1 ml $Na_2HPO_4$ | 6,0 |
| 83,0 ml $KH_2PO_4$ + 17,0 ml $Na_2HPO_4$ | 6,2 |
| 75,4 ml $KH_2PO_4$ + 24,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,4 |
| 65,3 ml $KH_2PO_4$ + 34,7 ml $Na_2HPO_4$ | 6,6 |

▼B

| | |
|---|---|
| 53,4 ml $KH_2PO_4$ + 46,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,8 |
| 41,3 ml $KH_2PO_4$ + 58,7 ml $Na_2HPO_4$ | 7,0 |
| 29,6 ml $KH_2PO_4$ + 70,4 ml $Na_2HPO_4$ | 7,2 |
| 19,7 ml $KH_2PO_4$ + 80,3 ml $Na_2HPO_4$ | 7,4 |
| 12,8 ml $KH_2PO_4$ + 87,2 ml $Na_2HPO_4$ | 7,6 |
| 7,4 ml $KH_2PO_4$ + 92,6 ml $Na_2HPO_4$ | 7,8 |
| 3,7 ml $KH_2PO_4$ + 96,3 ml $Na_2HPO_4$ | 8,0 |

▼B

C.8. **TOKSICITET FOR REGNORME**

TEST I SYNTETISK JORD

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

I denne laboratorietest tilsættes teststoffet til syntetisk jord, hvori der anbringes orme i 14 dage. Efter denne periode (og eventuelt efter syv dage) undersøges stoffets dødelige virkning på regnormene. Testen giver en metode til i løbet af relativt kort tid at foretage en screening af kemikaliers virkning på regnorme ved optagelse gennem huden eller føden.

1.2. DEFINITION OG ENHED

$LC_{50}$: Koncentration af et stof, som kan forventes at forårsage 50 % af testdyrenes død i løbet af testperioden.

1.3. REFERENCESTOF

Der anvendes regelmæssigt et referencestof til påvisning af, at testsystemets følsomhed ikke har ændret sig signifikant.

Som referencestof anbefales analytisk rent chloracetamid.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Jord er et variabelt medium, så der anvendes en omhyggeligt defineret syntetisk lerjord til denne test. Der holdes voksne regnorme af arten Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) i en veldefineret syntetisk jord, som er behandlet med forskellige koncentrationer af teststoffet. Beholdernes indhold spredes på en bakke 14 dage (og eventuelt syv dage) efter forsøgets indledning, og der optælles for hver koncentration, hvor mange regnorme der har overlevet.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Testen er beregnet til at være så reproducerbar som muligt med hensyn til testsubstrat og organisme. Dødeligheden hos kontroldyrene må ikke overstige 10 % ved testens afslutning; ellers er testen ugyldig.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. *Materialer*

1.6.1.1. Testsubstrat

Der anvendes veldefineret syntetisk jord som grundsubstrat.

a) Grundsubstrat (vægtprocent tørstof)

— 10 % sphagnum (så nær pH 5,5 til 6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt)

▼B

— 20 % kaolinholdigt ler, helst med over 50 % kaolinit

— ca. 69 % industrielt kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 0,05 til 0,2 mm). Hvis stoffet ikke er tilstrækkeligt let at opslæmme i vand, holdes 10 g pr. testbeholder tilbage for blanding med teststoffet senere

— ca. 1 % calciumcarbonat ($CaCO_3$), pulveriseret, kemisk rent, tilsat for at få en pH-værdi på 6,0 ± 0,5.

b) Testsubstrat

Testsubstratet består af grundsubstrat, teststof og deioniseret vand.

Vandindholdet svarer til ca. 25 til 42 vægtprocent af grundsubstratets tørstof. Substratets vandindhold bestemmes ved tørring af en prøve til konstant vægt ved 105 °C. Hovedkriteriet er, at den syntetiske jord er befugtet så meget, at der ikke er noget stående vand. Blandingen foretages omhyggeligt, således at der bliver en jævn fordeling af teststoffet og substratet. Metoden for tilsætning af teststoffet til substratet skal rapporteres.

c) Kontrolsubstrat

Kontrolsubstratet bestir af grundsubstrat og vand. Hvis der anvendes et tilsætningsstof, skal et ekstra kontrolsubstrat indeholde samme mængde af tilsætningsstoffet.

1.6.1.2. Testbeholdere

Glasbeholdere med er rumfang på ca. en liter (hensigtsmæssigt tildækket med plastlåg, skåle eller plastfolie med ventilationshuller), fyldt med en mængde vådt test- eller kontrolsubstrat svarende til 500 g substrattørstof.

1.6.2. *Testbetingelser*

Beholderne opbevares i klimakamre ved en temperatur pi 20 ± 2 °C og i konstant lys; Lysstyrken bør være 400 til 800 lux.

Testperioden er på 14 dage, men dødeligheden kan eventuelt vurderes syv dage efter testens indledning.

1.6.3. *Fremgangsmåde*

Testkoncentrationer

Koncentrationerne af teststof udtrykkes som stoffets vægt i forhold til grundsubstratets tørstofvægt (mg/kg).

Forprøve

Det koncentrationsområde, der netop forårsager dødelighed fra 0 til 100 % kan bestemmes ved en forprøve, der giver viden om de koncentrationsintervaller, der skal anvendes ved den endelige test.

▼B

Stoffet bør testes i følgende koncentrationer: 1 000, 100, 10, 1 og 0,1 mg/stof/kg testsubstrat (tørstofvægt).

Hvis der skal foretages en fuldstændig endelig test, vil én testgruppe pr. koncentration og én til den ubehandlede kontrolgruppe med hver ti orme være tilstrækkelig til forprøven.

Endelig test

Resultaterne af forprøven anvendes til at vælge mindst fem koncentrationer i en kvotientrække, der går fra 0 til 100 % dødelighed, og hvor den konstante faktor ikke må være over 1,8.

Ved test med disse koncentrationsrækker vil $LC_{50}$-værdien og dens konfidensgrænser kunne skønnes med størst mulig nøjagtighed.

Ved den endelige test anvendes der mindst fire testgrupper pr. koncentration og fire ubehandlede kontrolgrupper med hver ti orme. Resultaterne af disse gentagne grupper angives som en middelværdi og en standardafvigelse.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for $LC_{50}$-intervallet.

Blanding af grundsubstratet og teststoffet

Når det er muligt, tilberedes teststoffet uden anden tilsætning end vand. Umiddelbart før testens indledning blandes en emulsion eller dispersion af teststoffet i deioniseret vand eller andet opløsningsmiddel med grundsubstratet eller sprøjtes jævnt ud over dette med en fin kromatografisprøjte eller lignende.

Hvis teststoffet ikke er opløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform).

Kun midler, der let fordamper, må bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Testsubstratet beluftes inden brug, Den fordampede vandmængde erstattes. Kontrolsubstratet må indeholde eventuelle tilsætningsstoffer i samme mængde.

Hvis teststoffet ikke kan opløses, dispergeres eller emulgeres i organiske opløsningsmidler, blandes en blanding af finsand af formalet kvarts og den til behandling af 500 g tørstofvægt syntetisk jord nødvendige mængde teststof med 490 g tørstofvægt testsubstrat.

For hver testgruppe anbringes en mængde vådt testsubstrat svarende til 500 g tørstofvægt i hver glasbeholder, og ti regnorme, der i 24 timer er blevet tilvænnet i et lignende vådt grundsubstrat og derefter hurtigt afskyllet og afdryppet på filtrerpapir før brugen, anbringes på testsubstratets overflade.

▼B

Beholderne tildækkes med perforerede plastlåg, skåle eller folie for at forhindre, at substratet indtørrer, og de opbevares under testbetingelser i 14 dage.

Vurderingerne foretages 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning. Substratet spredes på en plade af glas eller rustfrit stål. Regnormene undersøges, og antallet af overlevende regnorme bestemmes. Regnorme anses for døde, hvis de ikke reagerer på en let, mekanisk påvirkning af forender.

I tilfælde af at undersøgelsen foretages efter syv dage, fyldes substratet atter i beholderen, og de overlevende regnorme genanbringes på den samme testsubstratoverflade.

1.6.4. *Testorganismer*

Testorganismerne bør være voksne Eisenia foetida (se anmærkningen i tillægget) (mindst to måneder gamle med bælte) af en vægt (våd) på 300 til 600 mg. (Med hensyn til opdrætningsmetode henvises til tillægget).

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING OG VURDERING AF RESULTATERNE

De anvendte teststofkoncentrationer rapporteres med henvisning til den procentvise dødelighed for hver koncentration.

Når de opnåede data er dækkende, kan $LC_{50}$ og dens konfidensgrænser (p = 0,05) bestemmes ved brug af standardmetoder (Litchfield and Wilcoxon, 1949, eller tilsvarende metode). $LC_{50}$ angives som mg teststof pr, kg testsubstrat (tørstofvægt).

I de tilfælde, hvor koncentrationskurvens hældning er for stejl til, at $LC_{50}$ kan beregnes, er en grafisk bestemmelse af denne værdi tilstrækkelig.

Hvis to på hinanden følgende koncentrationer med et forhold på 1,8 kun giver 0 og 100 % dødelighed, er disse to værdier tilstrækkelige som angivelse for $LC_{50}$-intervallet.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med ovenstående kvalitetskriterier

— angivelse af den foretagne test (forprøve og/eller endelig test)

— nøje beskrivelse af testbetingelserne eller angivelse af, at testen er foretaget i overensstemmelse med metoden; eventuelle afvigelser skal rapporteres

— nøje beskrivelse af, hvorledes teststoffet er blevet iblandet i grundsubstratet

— oplysninger om testorganismer (art, alder, gennemsnitsvægt samt minimums- og maksimumsvægt, betingelserne for avl og opdrætning samt leverandør)

▼B

— angivelse af den anvendte metode til bestemmelse af $LC_{50}$

— testresultaterne, herunder alle anvendte data

— beskrivelse af observerede symptomer eller adfærdsændringer hos testorganismerne

— dødelighed i kontrolgrupperne

— $LC_{50}$ eller højeste testkoncentration uden dødelighed og laveste testkoncentration med en dødelighed på 100 % 14 dage (og eventuelt syv dage) efter testens indledning

— afbildning af koncentrationsresponskurven

— resultater, der er opnået med referencestoffet enten i forbindelse med den pågældende test eller ved tidligere kvalitetskontrol-undersøgelser.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, 1977. Biology of Earthworms. London: Chapman and Hall, 331 pp.

(3) Bouche, M. B. 1972. Lombriciens de France, Écologie et Systématique. Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T.and Wilcoxon J., 1949. A simplified method of evaluaring dose-effect experiments J. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 99-113.

(5) EEC 1983. Development of a standardized labotatory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR. 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

*Tillæg*

**Avl og opdrætning af ormene før test**

Med henblik på avl anbringes 30 til 50 voksne orme i en avlekasse med frisk substrat og fjernes efter 14 dage. Disse dyr kan bruges til avl af senere grupper. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne (under de foreskrevne betingelser efter to til tre måneders forløb).

**Avls- og opdrætningsbetingelser**

| | |
|---|---|
| Klimakammer: | temperatur 20 ± 2 °C, helst med konstant lys (lysintensitet 400 til 800 lux). |
| Avlekasser: | Egnede lave beholdere med et rumfang på 10 til 20 l. |
| Substrat: | Eisenia foetida kan opdrættes i forskellige dyreekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Substratet må have en pH-værdi på ca. 6 til 7 (justeret med calciumcarbonat) og lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration). |
| | Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. |
| | Andre egnede fremgangsmåder ud over ovennævnte metode kan benyttes. |

*Anmærkning:* Der findes to racer af Eisenia foetida, som nogle systematikere har klassificeret som arter (Bouche, 1972). De er morfologisk set omtrent ens, men den ene, Eisenia foetida foetida, har typisk tværgående striber på leddene, hvad den anden, Eisenia foetida andrei, ikke har, og dennes farve er rødbroget. Så vidt muligt bør Eisenia foetida andrei anvendes. Andre arter kan anvendes, hvis den fornødne metodik er til rådighed.

▼B

C.9. **BIOLOGISK NEDBRYDNING**

ZAHN-WELLENS TEST

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Metoden har til formål at vurdere vandopløselige ikke flygtige organiske stoffers potentielle fuldstændige bionedbrydelighed, når de skal udsættes for forholdsvis høje koncentrationer af mikroorganismer under en statisk test.

Der kan forekomme fysisk/kemisk adsorption på de opslæmmede artikler, og der må tages hensyn hertil, når resultaterne fortolkes (jf. 3.2).

De stoffer, der skal undersøges, anvendes i koncentrationer svarende til DOC-værdier i området 50 til 400 mg/l eller COD-vædier i området 100 til 1 000 mg/l (DOC = opløst organisk kulstof; COD = kemisk iltforbrug). Disse forholdsvis høje koncentrationer har den fordel, at de i analytisk henseende er pålidelige. Forbindelser med toksiske egenskaber kan hæmme eller hindre nedbrydningsprocessen.

Ved denne metode anvendes måling af koncentrationer af opløst organisk kulstof eller af det kemiske iltforbrug til bedømmelse af teststoffets fuldstændige biologiske nedbrydning.

Samtidig anvendelse af en specifik analysemetode kan muliggøre vurdering af stoffets primære biologiske nedbrydning (dvs. den oprindelige kemiske forbindelses forsvinden).

Metoden finder kun anvendelse pi de organiske teststoffer, som ved koncentrationen under testen:

— er opløselige i vand under forsøgsbetingelserne

— har forsvindende lavt damptryk under forsøgsbetingelserne

— ikke hæmmer bakterier

— kun adsorberes i testsystemet i begrænset omfang

— ikke forsvinder fra testopløsningen som følge af skumning.

Oplysninger om mængdeforholdet mellem teststoffets hovedbestanddele vil være til nytte ved fortolkning af resultaterne, især hvis disse er lave eller usikre.

Ved fortolkningen af lave resultater og ved valget af passende testkoncentrationer er det ønskeligt at have oplysninger om stoffets giftvirkning over for mikroorganismer.

▼B

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Nedbrydningsgraden ved testens afslutning anføres således: Biologisk nedbrydelighed i Zahn-Wellens test:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

hvor:

$D_T$ = biologisk nedbrydning ( %) ved tidspunktet T

$C_A$ = DOC (eller COD)-værdier i forsøgsblandingen, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l). (DOC = opløst organisk kulstof, COD = kemisk iltforbrug)

$C_T$ = DOC- eller COD-værdier i forsøgsblandingen ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l)

$C_B$ = DOC- eller COD-værdi for blindprøven ved tidspunktet for prøveudtagning (mg/l)

$C_{BA}$ = DOC- eller COD-værdi for blindprøven, målt tre timer efter igangsætning af testen (mg/l).

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent.

Den procentvise nedbrydning er angiver som den procentvise DOC- (eller COD-) fjernelse af teststoffet.

Forskellen mellem den værdi, der er målt efter tre timer, og den beregnede, eller helst målte, startværdi kan give nyttige oplysninger om stoffets eliminering (jf. 3.2 »Fortolkning af resultater«).

1.3. REFERENCESTOFFER

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelse af nye stoffer; der kan dog endnu ikke anbefales bestemte referencestoffer.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Aktiveret slam, uorganiske næringsstoffer og teststoffet, der er den eneste kulstofkilde i vandig opløsning, anbringes sammen i en glasbeholder på 1 til 4 liter, som er forsynet med omrøring og beluftning. Blandingen omrøres og beluftes ved 20 til 25 °C under indirekte belysning eller mørke i op til 28 dage. Nedbrydningsprocessen følges ved bestemmelse af DOC- (eller COD-) værdier i den filtrerede opløsning en gang dagligt eller regelmæssigt med et andet passende mellemrum. Forholdet mellem den eliminerede DOC (eller COD) efter hvert tidsrum og værdier tre timer efter starten udtrykkes som procentvis biologisk nedbrydning og er et mål for nedbrydningsgraden på dette tidspunkt. Resultatet afbildes mod tiden, hvorved kurven over biologisk nedbrydning fremkommer.

Hvis der anvendes en specifik analysemetode, kan ændringer i det oprindelige stofs koncentration som følge af biologisk nedbrydning måles (primær bionedbrydelighed).

▼B

1.5. KVALITETSKRITERIER

Det er ved ringtest godtgjort, at denne metodes reproducerbarhed er tilfredsstillende.

Metodens følsomhed afhænger hovedsagelig af blindprøvens variationer og i mindre grad af nøjagtigheden ved bestemmelsen af opløst organisk kulstof og teststofkoncentrationen i væsken.

1.6. BESKRIVELSE AF FREMGANGSMÅDEN

1.6.1. *Forberedelser*

1.6.1.1. Reagenser

vand: drikkevand med mindre end 5 mg organisk kulstof pr. liter. Koncentrationen af calcium- og magnesiumioner må ikke overstige 2,7 mmol/l tilsammen; i modsat fald må der fortyndes passende med deioniseret eller destilleret vand

| | |
|---|---|
| svovlsyre, analyseren (A.R.): | 50 g/l |
| natriumhydroxidopløsning, A.R.: | 40 g/l |
| opløsning af uorganiske næringsstoffer: i 1 l deioniseret vand opløses: | |
| Ammoniumchlorid, $NH_4Cl$, A.R.: | 38,5 g |
| Natriumdihydrogenphosphat, $NaH_2PO_4 . 2H_2O$, A.R.: | 33,4 g |
| Kaliumdihydrogenphosphat, $KH_2PO_4$, A.R.: | 8,5 g |
| Dikaliummonohydrogenphosphat, $K_2HPO_4$, A.R.: | 21,75 g |

Blandingen fungerer dels som næringsstofkilde, dels som buffersystem.

1.6.1.2. Apparatur

glasbeholdere på 1 til 4 (f.eks. cylindriske beholdere)

omrører med rørehoved af glas eller metal på en passende aksel (omrøreren bør rotere 5 til 10 cm over beholderens bund). Der kan i stedet anvendes en magnetomrører med en 7 til 10 cm lang magnetpind

glasrør med indvendig diameter på 2 til 4 mm til beluftning. Rørets åbning bør befinde sig ca. 1 cm over beholderens bund

centrifuge (ca. 3 550 g)

pH-meter

apparat til måling af opløst ilt

papirfiltre

▼B

apparatur til membranfiltrering

membranfiltre med porestørrelse 0,45 μm. Membranfiltre er kun egnede, hvis der er vished for, at de hverken afgiver kulstof eller absorberer stoffet under filtreringen

analyseudstyr ti! bestemmelse af indholdet af organisk kulstof og det kemiske iltforbrug.

1.6.1.3. Tilberedning af inoculum

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg vaskes (flere gange) med vand (jf. ovenfor) ved centrifugering eller dekantering.

Det aktiverede slam skal være i passende stand. Sådant slam kan fås fra et velfungerende anlæg til spildevandsrensning. For at få så mange forskellige bakteriestammer som muligt kan det være bedre at blande inocula fra forskellige kilder (f.eks. forskellige rensningsanlæg, jordekstrakter, flodvand osv.).

Det aktiverede slams aktivitet kontrolleres, jf. »egnethedskontrol«.

1.6.1.4. Fremstilling af testopløsningerne

Til testbeholderen sættes 500 ml vand, 2,5 ml opløsning af uorganiske næringsstoffer pr. liter samt en mængde aktiveret slam, der svarer til 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter færdigblanding. Der tilsættes en så stor mængde stamopløsning af teststoffer, at den færdige blanding får en DOC-koncentration på 50 til 400 mg/l. Det tilsvarende COD-interval er 100 til 1 000 mg/l. Der fyldes op til i alt 1 til 4 l med vand. Valg af det samlede volumen afhænger af det antal prøver, der skal udtages til DOC- eller COD-bestemmelser, og det nødvendige analysevolumen.

Normalt kan et volumen på 2 l betragtes som tilstrækkeligt. Mindst én kontrolbeholder (blindprøve) sættes i gang samtidig med hver testserie; den indeholder kun aktiveret slam og opløsning af uorganiske næringsstoffer fortyndet med vand til samme totalvolumen som i testbeholderne.

1.6.2. *Testens gennemførelse*

Testbeholderne omrøres med magnetomrørere eller propelomrørere under indirekte belysning eller i mørke ved 20 til 25 °C. Beluftning sker med komprimeret luft, der om nødvendigt renses med et vatfilter og en vaskeflaske. Det må påses, at slammet ikke bundfælder, og at iltkoncentrationen ikke falder til under 2 mg/l.

pH-værdien kontrolleres regelmæssigt (f.eks. dagligt) og indstilles om nødvendigt til pH 7 til 8.

▼B

Lige før prøveudtagningen kompenseres der for tab ved fordampning ved tilsætning af deioniseret eller destilleret vand. Det kan f.eks. anbefales at afmærke væskehøjden i beholderen, før testen startes. Der sættes nye mærker efter hver prøveudtagning (uden beluftning og omrøring). De første-prøver udtages altid tre timer efter testens start, således at det kan konstateres, om testmaterialet adsorberes på det aktiverede slam.

Elimineringen af testmaterialet følges ved DOC- eller COD-bestemmelser dagligt eller regelmæssigt med et andet interval. Prøverne fra testbeholderen og blindforsøget filtreres gennem et omhyggeligt vasket papirfilter. De første 5 ml filtrat bortkastes. Slam, der er vanskeligt at filtrere, kan fjernes ved først at centrifugere i ti min. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC og COD. Testens løber i op til 28 dage.

*Anmærkning:* Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter. Membranfiltrene må hverken afgive eller adsorbere organisk materiale.

Egnethedskontrol af det aktiverede slam

I hver testserie bør indgå en beholder, der indeholder et kendt stof, således at man kan kontrollere egnetheden af det aktiverede slam. Til dette formål er diethylenglycol fundet egnet.

Adaptation

Hvis der foretages analyser med forholdsvis korte mellemrum (f.eks, dagligt), vil adaptation klart fremgå af nedbrydningskurven (jf. figur 2). Testen bør derfor ikke sættes i gang umiddelbart før weekenden.

Hvis der forekommer adaptation ved slutningen af perioden, kan testen fortsættes, indtil nedbrydningen er afsluttet.

*Anmærkning:* Hvis der er behov for større viden om det adapterede slams opførsel, udsattes det samme aktiverede slam endnu engang for det samme testmateriale efter følgende fremgangsmåde:

Omrøringen og beluftningen standses, og man lader det aktiverede slam bundfælde sig. Den ovenstående væske fjernes, der fyldes op til 2 l med vand og omrøres i 15 minutter, og blandingen henstår til ny bundfældning. Efter fjernelse af den ovenstående væske anvendes det tilbageblevne slam til gentagelse af testen med det samme materiale som under punkt 1.6.1.4 og 1.6.2. Det aktiverede slam kan isoleres ved centrifugering i stedet for bundfældning.

Det adapterede slam kan eventuelt blandes med frisk slam, så man når op på i alt 0,2 til 1,0 g tørstof pr. liter.

▼B

Analyse

Normalt filtreres prøver gennem et omhyggeligt vasket papirfilter (til vask anvendes deioniseret vand).

Prøver, der stadig er uklare, filtreres gennem et membranfilter (0,45 μm).

Der foretages dobbeltbestemmelse af DOC-koncentrationen i prøvefiltraterne (de første 5 ml bortkastes) med TOC-instrumentet. Hvis filtratet ikke kan analyseres-samme dag, skal det opbevares i køleskab til næste dag. Længere tids opbevaring kan ikke anbefales.

COD-koncentrationen bestemmes i prøvefiltraterne med et COD-analyseudstyr efter den fremgangsmåde, der er beskrevet i henvisning (2) nedenfor.

## 2. DATA OG VURDERING

Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC- og COD-koncentrationerne i prøverne ifølge 1.6.2. Nedbrydningen ved tidspunktet T beregnes med den formel (med definitioner), der anført under 1.2.

Nedbrydningsgraden afrundes til nærmeste hele procent. Den nedbrydning, der opnås ved slutningen af testen, anføres som »den biologiske nedbrydelighed ved Zahn-Wellens test«.

*Anmærkning*: Hvis der opnås fuldstændig nedbrydning før testperioden er udløbet og dette resultat bekræftes ved endnu en analyse den følgende dag, kan testen afsluttes.

## 3. RAPPORTERING

### 3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— stoffets begyndelseskoncentration

— alle andre oplysninger og forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, et eventuelt referencestof og blindforsøget

— koncentrationen efter tre timer

— kurve over biologisk nedbrydning med forklaring

— hvornår og hvor prøveorganismerne er udtaget, adaptionsgrad, anvendt koncentration osv.

— fyldestgørende begrundelse for alle afvigelser fra fremgangsmåden.

### 3.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Gradvis fjernelse af DOC (COD) i løbet af dage eller uger viser, at teststoffet nedbrydes biologisk.

▼B

Fysisk/kemisk adsorbtion kan dog i visse tilfælde spille en vis rolle, og et tegn herpå er, at der inden for de første tre timer sker fuldstændig eller delvis fjernelse, og at forskellen mellem supernatantvæsken fra kontrolforsøget og prøven bliver liggende på et uventet lavt niveau.

Det er nødvendigt at foretage yderligere testning, hvis der skal skelnes mellem biologisk nedbrydning (eller delvis biologisk nedbrydning) og adsorption.

Dette kan gøres på flere måder, mest troværdigt ved at anvende supernatantvæsken som inoculum i en basissat test (helst en respirometrisk test).

Teststoffer, der giver høj fjernelse af DOC (COD), som ikke skyldes adsorption, ved denne test, bør betragtes som potentielt biologisk nedbrydelige. Delvis fjernelse, som ikke skyldes adsorption, betyder, at kemikaliet i hvert fald i et vist omfang nedbrydes biologisk. Ringe eller ingen fjernelse af DOC (COD) kan skyldes, at teststoffet hæmmer mikroorganismerne; dette kan undertiden også vise sig ved, at slammet opløses og forsvinder, hvorved supernatantvæsken bliver uklar. Testen bør gentages med en lavere koncentration af teststof.

Anvendelse af en stofspecifik analysemetode eller $^{14}C$-mærket teststof kan give større følsomhed. Hvis der anvendes $^{14}C$-mærket teststof, vil påvisning af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der er tale om biologisk nedbrydning.

Dersom resultaterne anføres som primær biologisk nedbrydning, bør der om muligt anføres en forklaring pi den kemiske strukturændring, som fører til, at analyseresultaterne for det oprindelige teststof falder.

Valget af analysemetode skal underbygges, og analyseresultaterne for blindprøven skal anføres.

## 4. HENVISNINGER

(1) OECD, Paris, 1981 Test Guideline 302 B. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) Bilag V C.9 Nedbrydning: Kemisk iltforbrug. Kommissionens direktiv 84/449/EØF, *De Europæiske Fællesskabers Tidende,* L 251 af 19.9.1984.

▼B

*Tillæg*

EKSEMPLER PÅ EVALUERING

| | |
|---|---|
| Organisk forbindelse: | 4-ethoxybenzoesyre |
| Teoretisk testkoncentration: | 600 mg/l |
| Teoretisk DOC: | 390 mg/l |
| Inoculum | rensningsanlægget ... |
| Koncentration: | 1 g tørstof pr. liter |
| Eventuel adaptation: | ikke adapteret |
| Analyse: | DOC-bestemmelse |
| Testmængde: | 3 ml |
| Kontrolstof: | diethylenglycol |
| Stoffets toksicitet | ingen giftvirkning under 1 000 mg/l<br>anvendt prøve: fermeteringsglas |

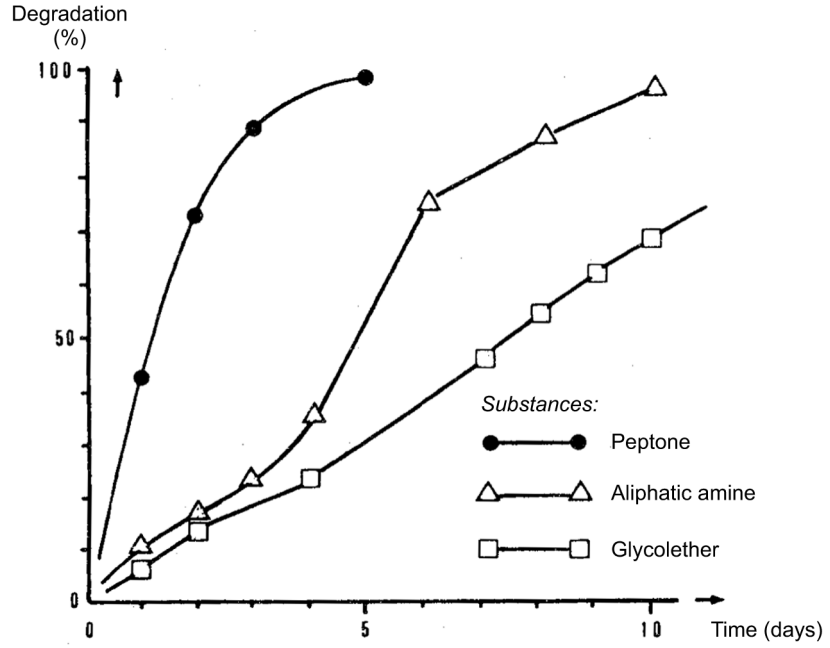
| Tidspunkt | Kontrolstof | | | | Teststof | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Blindprøve DOC (1) mg/l | DOC (1) mg/l | DOC netto mg/l | Nedbrydning % | DOC (1) mg/l | DOC netto mg/l | Nedbrydning % |
| 0 | — | — | 300,0 | — | — | 390,0 | — |
| 3 timer | 4,0 | 298,0 | 294,0 | 2 | 371,6 | 367,6 | 6 |
| 1 dag | 6,1 | 288,3 | 282,2 | 6 | 373,3 | 367,2 | 6 |
| 2 dage | 5,0 | 281,2 | 276,2 | 8 | 360,0 | 355,0 | 9 |
| 5 dage | 6,3 | 270,5 | 264,2 | 12 | 193,8 | 187,5 | 52 |
| 6 dage | 7,4 | 253,3 | 245,9 | 18 | 143,9 | 136,5 | 65 |
| 7 dage | 11,3 | 212,5 | 201,2 | 33 | 104,5 | 93,2 | 76 |
| 8 dage | 7,8 | 142,5 | 134,7 | 55 | 58,9 | 51,1 | 87 |
| 9 dage | 7,0 | 35,0 | 28,0 | 91 | 18,1 | 11,1 | 97 |
| 10 dage | 18,0 | 37,0 | 19,0 | 94 | 20,0 | 2,0 | 99 |

(1) Gennemsnit af tredobbeltbestemmelse.

▼B

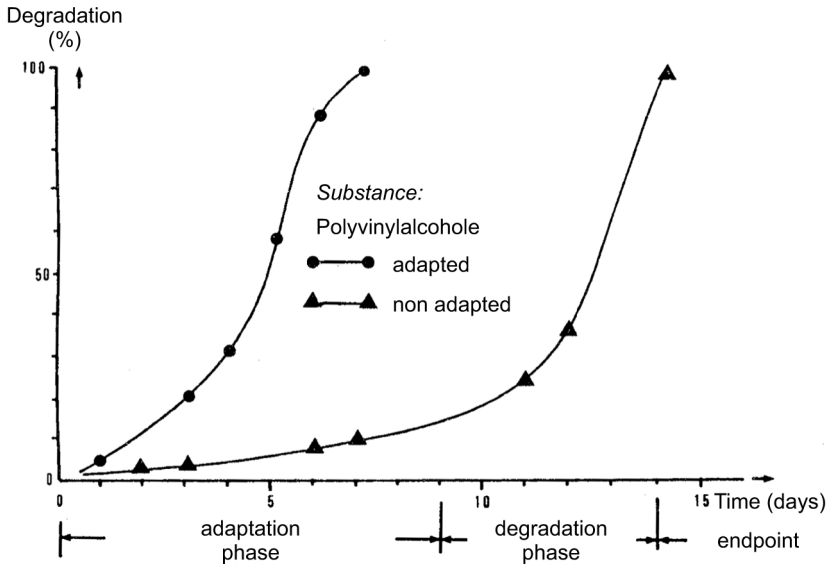
*Figur 1*

**Eksempler på kurver over biologisk nedbrydning**




*Figur 2*

**Eksempler på slamadaptation**



▼M4

C.10. **SIMULERINGSFORSØG VEDRØRENDE AEROB SPILDEVANDSRENSNING: C.10.A: AKTIVEREDE SLAMENHEDER — C.10.B: BIOFILM**

**C.10.A:. Aktiverede slamenheder**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 303 (2001). I 1950'erne opdagede man, at nye overfladeaktive stoffer forårsagede omfattende skumdannelse i spildevandsrensningsanlæg og i floder. De blev ikke fuldstændigt elimineret i den aerobe behandling, og i visse tilfælde begrænsede de elimineringen af andre organiske stoffer. På den baggrund blev der indledt mange undersøgelser af, hvordan overfladeaktive stoffer kunne fjernes fra spildevand, og om nye industrifremstillede kemikalier kunne indgå i spildevandsrensning. Til det blev der anvendt to modelenheder, der repræsenterede de to hovedtyper af aerob biologisk spildevandsrensning (aktiveret slam og nedsivningsfiltrering). Det ville have været umuligt og meget dyrt at distribuere alle nye kemikalier og overvåge store rensningsanlæg, selv på lokalt plan.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

**Aktiverede slamenheder**

2. Modeller for aktiverede slamenheder er beskrevet i størrelser fra 300 ml op til ca. 2 000 ml. Nogle efterlignede nøje fuldskalaanlæg med tanke til bundfældning af slam, hvor det bundfældede slam blev pumpet tilbage til beluftningstanken, mens andre ikke var udstyret med bundfældningsanlæg, f.eks. Swisher (1). Størrelsen på forsøgsenhederne er et kompromis. De skal på den ene side være store nok til mekanisk drift og produktion af et tilstrækkeligt volumen af prøver, uden at det påvirker driften, og på den anden side må de ikke være så store, at det stiller for store krav til plads og materialeforbrug.

3. To typer forsøgsenheder, der anvendes hyppigt og med tilfredsstillende resultat, er Husmann-enheder (2) og Porous Pot-enheder (porøse krukker) (3) (4), der først blev anvendt i forsøg med overfladeaktive stoffer. Begge disse typer er beskrevet i denne testmetode. Andre typer har også været anvendt med tilfredsstillende resultater, f.eks. Eckenfelder (5). På grund af de relativt høje omkostninger og den store arbejdsindsats, der kræves for at udføre denne simuleringstest, blev der parallelt med disse gennemført enklere og billigere screeningstest, som er beskrevet i kapitel C.4 A-F i dette bilag (6). Erfaringer med mange overfladeaktive stoffer og andre kemikalier har vist, at de stoffer, der bestod screeningstestene (let bionedbrydelige), også blev nedbrudt i simuleringstesten. Nogle af de stoffer, der ikke bestod screeningstestene, bestod testene for iboende bionedbrydelighed (kapitel C.12 (7) og C.19 (8) i dette bilag), men kun nogle fra denne gruppe blev nedbrudt i simuleringstesten, hvorimod de kemikalier, der ikke bestod testene for iboende bionedbrydelighed, ikke blev nedbrudt i simuleringstestene (9) (10) (11).

4. I visse tilfælde er det tilstrækkeligt at gennemføre simuleringstests under et enkelt sæt driftsbetingelser. Resultaterne udtrykkes som den procentvise eliminering af testkemikaliet eller af opløst organisk kulstof (DOC). En sådan test beskrives i denne testmetode. I modsætning til den foregående version af dette kapitel, der kun beskrev én type forsøgsenheder til behandling af syntetisk spildevand i koblet tilstand, der anvendte en forholdsvis grov slamoverløbsmetode, giver denne tekst mulighed for en række

▼M4

variationer. Alternativer til typen af forsøgsenheder, virkningsmåde samt spildevands- og slambortskaffelse beskrives. Denne tekst ligger tæt op ad teksten i ISO 11733 (12), der blev nøje gennemgået i forbindelse med forberedelsen. Metoden har dog ikke været underkastet en ringtest.

5. Til andre formål skal koncentrationen af testkemikaliet i udløbet kendes mere præcist, og der er derfor behov for en mere omfattende metode. Overløbsprocenten for slam skal f.eks. kontrolleres mere præcist hele døgnet og i løbet af hele testperioden, og enhederne skal fungere ved forskellige overløbsprocenter. For at opnå en fyldestgørende metode bør testene ligeledes gennemføres ved to eller tre forskellige temperaturer. En sådan metode er beskrevet af Birch (13) (14) og sammenfattet i tillæg 6. Den nuværende viden er imidlertid ikke tilstrækkelig til at afgøre, hvilken af de kinetiske modeller der kan anvendes i forbindelse med bionedbrydning af kemikalier ved spildevandsrensning og i vandmiljøet generelt. Anvendelsen af Monod-kinetik, der beskrives i tillæg 6 som et eksempel, er begrænset til kemikalier, der forekommer i en koncentration på 1 mg/l og derover, men dette er efter nogle forskeres opfattelse endnu ikke dokumenteret. Tillæg 7 omhandler test ved koncentrationer, der mere realistisk afspejler koncentrationerne i spildevand. Disse test og testene i tillæg 6 er dog anført i tillæg og ikke som separate testmetoder.

*Filtre*

6. Det har været meget mindre fokus på modeller med nedsivningsfiltre. Det skyldes sandsynligvis, at de er mere besværlige og ikke så kompakte som modeller baseret på aktiveret slam. Gerike et al. har udviklet nedsivningsfiltre og anvendt dem i koblet tilstand ((15). Disse filtre var relativt store (højde 2 m, volumen 60 l), og hvert filter krævede en spildevandsmængde på helt op til 2 l/h. Baumann et al. (16) simulerede nedsivningsfiltre ved at sætte strips af »polyesterfleece« ind i rør på 1 m (14 mm indvendig diameter), efter at stripsene havde været nedsænket i koncentreret aktiveret slam i 30 minutter. Testkemikaliet blev som eneste C-kilde i en opløsning af mineralsalte hældt ned i det lodrette rør, hvorefter den biologiske nedbrydning blev vurderet ud fra målinger af DOC i udløbet og $CO_2$ i den udledte gas.

7. Biofiltre er blevet simuleret på en anden måde (15). De indre overflader af roterende rør, der var skråtstillet i en spids vinkel i forhold til vandret, blev tilført spildevand (ca. 250 ml/h) med og uden testkemikaliet. De opsamlede udløb blev derefter analyseret for opløst organisk kulstof (DOC) og/eller det specifikke testkemikalie.

TESTENS PRINCIP

8. Denne metode er udviklet til at bestemme elimineringen og den primære og/eller ultimative biologiske nedbrydning af vandopløselige organiske kemikalier ved hjælp af aerobe mikroorganismer i et kontinuerligt drevet testsystem, der simulerer processen for aktiveret slam. Et let biologisk nedbrydeligt organisk materiale og det organiske testkemikalie forsyner mikroorganismerne med kulstof og energi.

9. To kontinuerligt drevne testenheder (anlæg med aktiveret slam eller porøse krukker) køres parallelt under identiske betingelser, der vælges, så de passer til testens formål. Normalt er den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid seks timer, og den gennemsnitlige slamalder (slamretentionstid) er 6-10 dage. Slam bortskaffes ved hjælp af én af to metoder, hvor testkemikaliet normalt tilsættes indløbet (organisk medium) på den ene enhed i en koncentration på mellem 10 mg/l DOC og 20 mg/l DOC. Den anden enhed bruges som kontrolenhed for at bestemme den biologiske nedbrydning af det organiske medium.

▼M4

10. I hyppigt udtagne prøver af udløbet bestemmes først og fremmest det opløste organiske kulstof eller det kemiske iltforbrug (COD). Ligeledes bestemmes ud fra specifikke analyser koncentrationen af testkemikaliet (hvis påkrævet) i spildevandet fra den enhed, der får tilført testkemikaliet. Det antages, at forskellen mellem koncentrationerne af DOC eller COD i udløbet fra test- og kontrolenhederne skyldes testkemikaliet eller dets organiske metabolitter. Forskellen sammenlignes med koncentrationen af DOC eller COD i indløbet, der skyldes det tilførte testkemikalie, med henblik på at bestemme elimineringen af testkemikaliet.

11. Bionedbrydning kan normalt adskilles fra bioadsorption ved omhyggeligt at undersøge kurven for elimineringstid og bekræftes normalt af en test for umiddelbar bionedbrydning, hvor der anvendes et akklimatiseret inokulum fra den enhed, der får tilført testkemikaliet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

12. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionsegenskaber skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt. Normalt kan flygtige og uopløselige kemikalier ikke testes, medmindre der træffes særlige forholdsregler (se tillæg 5). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal også kendes for at kunne beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrenes målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), opløst organisk kulstof (DOC) og kemisk iltforbrug (COD).

13. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4) kan bruges ved valg af hensigtsmæssige testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

14. I den første anvendelse af denne simuleringstest (kontroltest) i forbindelse med primær bionedbrydning af overfladeaktive stoffer skal der fjernes over 80 % af det specifikke kemikalie, inden det overfladeaktive stof må markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof må markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for eliminering benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. Resultater har en tendens til at følge et mønster med alt eller intet. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for bionedbrydelighed.

15. Der er relativt få kemikalier (f.eks. overfladeaktive stoffer) til stede i spildevand i de koncentrationer (ca. 10 mg C/l), der anvendes i denne test. Nogle kemikalier kan være hæmmende ved disse koncentrationer, mens kinetikken for eliminering af andre kemikalier kan være forskellig ved lave koncentrationer. En mere præcis vurdering af nedbrydningen kunne gennemføres ved hjælp af modificerede metoder, hvor man benytter realistisk lave koncentrationer af testkemikaliet, og de indsamlede data kunne bruges til at beregne kinetiske konstanter. De nødvendige forsøgsteknikker er imidlertid endnu ikke fuldt validerede, og de kinetiske modeller, der beskriver reaktionerne med hensyn til bionedbrydning, er heller ikke udarbejdet (se tillæg 7).

▼M4

REFERENCEKEMIKALIER

16. For at sikre, at forsøget gennemføres korrekt, bør kemikalier, hvis opførsel kendes, jævnligt testes sideløbende med undersøgelsen af testkemikalier. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre, 1-naphthoesyre osv. (9) (10) (11).

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

17. Der har udarbejdet langt færre rapporter om simuleringstest end om test for let bionedbrydelighed. Reproducerbarheden mellem (samtidige) replikater er god (inden for 10-15 %) for testkemikalier, der er nedbrudt 80 % eller mere, mens der for mindre nedbrudte kemikalier er større variationer. Ligeledes er der i forbindelse med visse borderline-kemikalier konstateret meget spredte resultater (f.eks. 10 % og 90 %) på forskellige tidspunkter i løbet af testperioden på ni uger.

18. Der er konstateret meget begrænset forskel i de resultater, der er opnået med de to typer forsøgsenheder. Visse kemikalier er dog i højere grad og mere konsistent blevet nedbrudt i forbindelse med husholdningsspildevand end med syntetisk spildevand som defineret af OECD.

BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

**Apparatur**

*Testsystem*

19. Testsystemet for et enkelt testkemikalie består af en testenhed og en styreenhed. I de tilfælde, hvor der kun gennemføres specifikke analyser (primær bionedbrydning), kræves der dog kun en testenhed. En og samme styreenhed kan benyttes til flere forskellige testenheder, der modtager enten de samme eller forskellige testkemikalier. I tilfælde af kobling (tillæg 3) skal hver enkelt testenhed have sin egen styreenhed. Testsystemet kan være en aktivslamanlægsmodel, dvs. en Husmann-enhed (tillæg 1, figur 1) eller en porøs krukke (tillæg 1, figur 2). I begge tilfælde kræves opbevaringstanke af tilstrækkelig størrelse til indløb og udløb, og der kræves pumper til dosering af indløbet enten blandet med opløsningen af testkemikaliet eller separat.

20. Hver aktivslamanlægsenhed består af en beluftningstank med en kendt kapacitet på ca. 3 l aktiveret slam og en separator (sekundær klaringstank), der indeholder ca. 1,5 l. De anførte volumener kan i et vist omfang ændres ved at justere separatorens højde. Tanke af forskellige størrelser tillades, hvis de benyttes med tilsvarende hydrauliske belastninger. Hvis det ikke er muligt at holde temperaturen i testlokalet inden for det ønskede område, anbefales det at benytte tanke med vandkappe med temperaturreguleret vand. En luftpumpe eller doseringspumpe pumper det aktiverede slam fra separatoren over i beluftningstanken enten kontinuerligt eller intermitterende med regelmæssige intervaller.

21. Systemet med porøse krukker består af en indre porøs cylinder med en konisk bund, der er monteret inde i en lidt større tank af samme form, men som er fremstillet af et vandtæt plastmateriale. Et velegnet materiale til en porøs krukke er porøs polyethylen med en maksimal porestørrelse på 90 µm og en tykkelse på 2 mm. Slammet adskilles fra det behandlede organiske materiale i kraft af differentieret passage gennem den porøse væg. Udløbet opsamles i det ringformede rum, hvorfra det løber over i opsamlingstanken. Der sker ingen bundfældning, og der intet returløb af slam. Hele systemet kan opstilles i et termostatstyret vandbad. Porøse krukker kan i starten blive tilstoppede og dermed løbe over. I så fald skal

▼M4

den porøse foring udskiftes med en ren foring, efter at slammet er suget fra krukken over i en ren spand, og den tilstoppede foring er fjernet. Efter aftørring af den vandtætte udvendige cylinder monteres en ren foring, og slammet returneres til krukken. Slam, der sidder fast på siderne af den tilstoppede foring, skrabes også omhyggeligt af og hældes tilbage. Rengør først tilstoppede krukker med en tynd vandstråle, så fastsiddende slam fjernes. Nedsænk derefter krukkerne i en fortyndet opløsning af natriumhypochlorit og dernæst i vand, og afskyl dem til sidst omhyggeligt i vand.

22. Der kræves særlige teknikker til beluftning af slammet i beluftningstankene i begge systemer, f.eks. sintrede klodser (diffusionssten) og trykluft. Luften skal renses, eventuelt ved at passere et særligt filter, og skylles. En passende luftmængde skal passere gennem systemet for at opretholde de aerobe betingelser og for at holde slammet konstant i suspension i løbet af testen.

*Filtreringsapparat eller centrifuge*

23. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 μm) til adsorption af opløselige organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 $m/s^2$.

*Analyseudstyr*

24. Apparatur, der bruges til bestemmelse af:

— DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof) eller COD (kemisk iltforbrug)

— specifikt kemikalie, hvis påkrævet

— suspenderede stoffer, pH, iltkoncentration i vand

— temperatur, syreindhold og alkalinitet

— ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold.

*Vand*

25. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC. Bestem alkalinitet, hvis den ikke allerede er kendt.

26. Deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

*Organisk materiale*

27. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist (11) (14), at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent og endda eliminering og bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Endelig stabiliserer konstant eller intermitterende tilsætning af husholdningsspildevand ofte det aktiverede slam og dermed den vigtige evne til effektiv bundfældelse. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC eller COD i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumdihydrogenfosfat), hvis materialets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. 7,5 ± 0,5 i beluftningstanken under udførelsen af testen. Mængden af buffer, der skal tilsættes, og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde. Når blandinger benyttes enten kontinuerligt eller intermitterende, skal DOC (eller COD) i blandingen holdes på et nogenlunde konstant niveau, f.eks. ved hjælp af fortynding med vand.

▼M4

*Syntetisk spildevand*

28. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat ($K_2HPO_4$): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Hvis der kræves et knapt så koncentreret indløb, kan det syntetiske spildevand fortyndes (f.eks. 1:1) med ledningsvand for at opnå en koncentration på ca. 50 mg/l. Et sådant svagere indløb vil give mulighed for en bedre vækst af nitrificerende organismer, og denne modifikation bør anvendes, hvis simuleringen af nitrificerende spildevandsplanter skal undersøges. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

*Husholdningsspildevand*

29. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsagelig modtager husholdningsspildevand. Spildevandet indsamles før den primære sedimentering fra overløbskanalen ved den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring (normalt dog højst syv dage) ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

*Aktiveret slam*

30. Aktiveret slam til inokulering indsamles fra beluftningstanken i et velfungerende spildevandsanlæg eller fra en aktiveret slamenhed i laboratorieskala, der hovedsagelig behandler husholdningsspildevand.

*Stamopløsninger af testkemikaliet*

31. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Oplysninger om uopløselige og flygtige kemikalier findes i tillæg 5. Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliets vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle værdi for at fastslå, hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.

▼M4

32. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på 7 ± 0,5. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

FREMGANGSMÅDE

33. Fremgangsmåden er beskrevet for aktiverede slamanlæg. Den skal tilpasses på enkelte områder til brug i systemet med porøse krukker.

*Fremstilling af inokulum*

34. Ved begyndelsen af testen podes testsystemet med aktiveret slam eller med et inokulum, der indeholder en lav koncentration af mikroorganismer. Hold inokulum beluftet ved stuetemperatur, indtil det er opbrugt, og brug det inden for 24 timer. I det første tilfælde udtages en prøve af aktiveret slam fra beluftningstanken i et effektivt drevet biologisk spildevandsrensningsanlæg eller et laboratorierensningsanlæg, der primært modtager husholdningsspildevand. Hvis nitrificerende forhold skal simuleres, udtages slam fra et nitrificerende spildevandsrensningsanlæg. Bestem koncentrationen af suspenderede stoffer, og koncentrer om nødvendigt slammet ved bundfældning, så testsystemet tilføres et minimalt volumen. Sørg for, at udgangskoncentrationen af faststof er ca. 2,5 g/l.

35. I det andet tilfælde anvendes 2-10 ml/l udløb fra et biologisk anlæg til rensning af husholdningsspildevand som inokulum. For at få så mange forskellige bakteriearter som muligt kan det være nyttigt at tilføje inokula fra forskellige andre kilder, f.eks. overfladevand. I så fald vil det aktiverede slam udvikle sig og vokse i testsystemet.

*Dosering af organisk materiale*

36. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen. Testsystemerne samles på et sted, hvor temperaturen er kontrolleret (normalt inden for 20-25 °C). Hvis det ikke er muligt, benyttes testanlæg med vandkappe. Fremstil en tilstrækkelig mængde af det krævede organiske materiale (afsnit 27-29). Fyld først beluftningstank og separator med det organiske materiale, og tilsæt inokulum (afsnit 34 og 35). Start beluftningen, så slammet holdes opslæmmet og i aerob tilstand, og påbegynd dosering af indløb og genanvendelse af det bundfældede slam. Hæld organisk materiale fra opbevaringstankene over i beluftningstankene (afsnit 20 og 21) i test- og kontrolenhederne, og opsaml de respektive udløb i tilsvarende opbevaringstanke. For at opnå den normale hydrauliske retentionstid på seks timer pumpes det organiske materiale ved 0,5 l/h. Denne hastighed bekræftes ved at måle den daglige mængde organisk materiale og registrere reduktionen i volumen af materialet i opbevaringstankene. Andre doseringsmetoder anvendes, hvis virkningen af intermitterende frigivelse og »chok«-tilsætning af kemikalier skal bestemmes.

37. Hvis det organiske materiale er fremstillet til brug i en periode længere end én dag, skal det nedkøles til ca. 4 °C eller konserveres på anden måde for at forhindre mikrobiel vækst og bionedbrydning uden for testenhederne (afsnit 29). Hvis der benyttes syntetisk spildevand, kan en koncentreret stamopløsning fremstilles og opbevares ved ca. 4 °C (f.eks. 10 gange den normale koncentration, afsnit 28). Denne stamopløsning kan omhyggeligt opblandes med den korrekte mængde ledningsvand inden brug. Den kan også tilføres direkte, mens den korrekte mængde ledningsvand tilføres separat.

▼M4

*Dosering af testkemikalie*

38. Tilsæt den korrekte mængde stamopløsning af testkemikaliet (afsnit 31) til opbevaringstanken med indløb, pump det direkte med en separat pumpe over i beluftningstanken. Den normale gennemsnitlige testkoncentration i indløbet bør være mellem 10 mg/l og 20 mg/l DOC med en højeste koncentration på maks. 50 mg/l. Hvis vandopløseligheden af testkemikaliet er lav, eller hvis der er sandsynlighed for, at der vil opstå toksiske virkninger, skal koncentrationen reduceres til 5 mg/l DOC eller mindre, men kun hvis der benyttes en relevant specifik analysemetode (dispergerede testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan tilsættes ved hjælp af særlige tilsætningsteknikker, se tillæg 5).

39. Begynd at tilsætte testkemikaliet efter en periode, hvor systemet har stabiliseret sig og effektivt reducerer DOC i det organiske materiale (ca. 80 %). Det er vigtigt at kontrollere, at alle enheder fungerer lige effektivt, inden testkemikaliet tilsættes. Hvis de ikke gør det, hjælper det normalt at blande de enkelte slamportioner og derefter fordele slammet i lige store portioner til de enkelte enheder. Når et inokulum af (ca.) 2,5 g/l (tørvægt) aktiveret slam er brugt, kan testkemikaliet tilsættes fra begyndelsen af testen, idet direkte tilsætning af stigende mængder fra begyndelsen har den fordel, at det aktiverede slam bedre kan tilpasse sig testkemikaliet. Uanset hvordan testkemikaliet tilsættes, bør gennemstrømningshastigheden og/eller volumen i opbevaringstankene måles med regelmæssige intervaller.

*Håndtering af aktiveret slam*

40. I løbet af testen stabiliserer koncentrationen af faststofferne i aktiveret slam sig normalt mellem grænseværdier, uanset det anvendte inokulum, i intervallet mellem 1 og 3 g/l (tørvægt) afhængigt af kvalitet og koncentration af det organiske materiale, driftsbetingelser, de anvendte mikroorganismers fysiske tilstand og påvirkningen fra testkemikaliet.

41. Bestem enten de suspenderede stoffer i beluftningstankene bestemmes mindst én gang om ugen, og bortskaf det overskydende slam for at holde koncentrationen på 1 g/l til 3 g/l (tørvægt), eller kontroller den gennemsnitlige slamalder ved en konstant værdi, normalt inden for intervallet 6 til 10 dage. Hvis der f.eks. er valgt en slamretentionstid på otte dage, skal der dagligt fjernes og bortskaffes 1/8 af det aktiverede slams volumen i beluftningstanken. Dette skal udføres dagligt eller fortrinsvis ved hjælp af en automatisk intervaldrevet pumpe. Selv om koncentrationen af suspenderede stoffer holdes konstant eller inden for et snævert interval, opnås der ikke en konstant slamretentionstid (SRT), som er den driftsvariabel, der bestemmer værdien af koncentrationen af testkemikaliet i udløbet.

42. I løbet af hele testen skal slam, der sidder på væggene i beluftningstank og separator, fjernes, så det igen suspenderes. Kontroller og rengør regelmæssigt alle rør og slanger for at forhindre dannelsen af biofilm. Recirkuler det bundfældede slam fra separatoren til beluftningstanken, helst ved hjælp af intermitterende pumpning. Der sker ingen recirkulation i systemet med porøse krukker. Det skal dog kontrolleres, at der er indsat rene indvendige krukker, inden volumen i tanken stiger væsentligt (afsnit 21).

43. Der kan forekomme dårlig bundfældning og tab af slam i Husmann-enhederne. Dette kan afhjælpes ved samtidig at udføre en eller flere af de handlinger, der er anført nedenfor, i test- og kontrolenheder:

— Frisk slam eller flokkuleringsmiddel (f.eks. 2 ml/krukke på 50 g/l $FeCl_3$) tilsættes med regelmæssige mellemrum, f.eks. hver uge. Det skal dog kontrolleres, at der ikke sker nogen reaktion eller udfældning af testkemikaliet med $FeCl_3$.

▼M4

— Trykluftpumpen kan erstattes med en slangepumpe, således at slam kan recirkuleres i en strøm, der omtrentligt svarer til den krævede indløbsstrøm, og således at der kan dannes en anaerob zone i det bundfældede slam (trykluftpumpens geometri begrænser minimumsgennemstrømningen af returslam til ca. det 12-dobbelte af indløbets).

— Slammet kan intermitterende pumpes fra separatoren til beluftningstanken, f.eks. 5 minutter hver 2,5 time for at recirkulere 1-1,5 l/h.

— Et ikke-toksisk skumdæmpningsmiddel i mindste koncentration kan bruges til at forhindre tab som følge af skumdannelse (f.eks. silikoneolie).

— Luft kan presses gennem slammet i separatoren i korte chokbølger (f.eks. 10 sekunder hver time).

— Det organiske materiale kan tilsættes beluftningstanken med bestemte intervaller (f.eks. 3-10 minutter hver time).

*Kontrol og analyse*

44. Med regelmæssige mellemrum måles den opløste iltkoncentration, temperaturen og pH-værdien af det aktiverede slam i beluftningstankene. Sørg for, at der altid er tilstrækkeligt ilt til stede (> 2 mg/l), og at temperaturen holdes inden for det krævede interval (normalt 20-25 °C). Hold pH på 7,5 ± 0,5 ved at tilsætte små mængder uorganisk base eller syre til beluftningstanken eller til indløbet eller ved at øge det organiske materiales bufferkapacitet (se afsnit 27). I forbindelse med nitrifikation udvikles syre. Oxidering af 1 mg N producerer en mængde, der svarer til ca. 7 mg $CO_3^-$. Målefrekvensen afhænger af den parameter, der skal måles, og af systemets stabilitet og kan variere mellem daglige og ugentlige målinger.

45. Måling af DOC eller COD i indløb til kontrol- og testbeholdere. Koncentrationen af testkemikalie i testindløbet måles ved hjælp af specifik analyse, eller den anslås ud fra koncentrationen i stamopløsningen (afsnit 31), den anvendte mængde og mængden af spildevand, der tilføres testenheden. Det anbefales, at koncentrationen af testkemikaliet beregnes for at reducere variabiliteten i koncentrationsdata.

46. Der udtages relevante prøver fra det indsamlede udløb (f.eks. sammensatte prøver over 24 timer), og de filtreres gennem en membran med em porestørrelse på 0,45 μm. De kan også centrifugeres ved ca. 40 000 $m/s^2$ i ca. 15 minutter. Centrifugering bør benyttes, hvis filtrering er besværlig. Der foretages mindst dobbeltbestemmelse af DOC eller COD for at måle den ultimative bionedbrydning og evt. den primære bionedbrydning ved hjælp af en analyse, der er specifik for testkemikaliet.

47. Anvendelsen af COD kan medføre analyseproblemer ved lave koncentrationer og anbefales derfor kun, hvis der benyttes en tilstrækkelig høj testkoncentration (ca. 30 mg/l). Ved kraftigt adsorberende kemikalier anbefales det ligeledes, at mængden af adsorberet kemikalie i slammet måles ved hjælp af en analyseteknik, der er specifik for testkemikaliet.

48. Hyppigheden af prøvetagning afhænger af testens forventede varighed. En anbefalet hyppighed er tre gange pr. uge. Når enhederne kører effektivt, kan der gå fra en uge til højst seks uger efter tilsætning af testkemikaliet, inden tilpasningsfasen har nået et stabilt niveau (steady state). Der indsamles mindst 15 gyldige værdier i plateaufasen (afsnit 59), som normalt varer tre uger, inden testresultatet evalueres. Testen kan gennemføres, hvis der opnås en tilstrækkelig elimineringsgrad (f.eks. > 90 %), og disse 15 værdier, som repræsenterer analyser, der er udført hver arbejdsdag i tre uger, er tilgængelige. Testvarigheden bør normalt ikke overstige 12 uger efter tilsætning af testkemikaliet.

▼M4

49. Hvis slammet nitrificerer, og hvis testkemikaliets indvirkning på nitrificeringen skal undersøges, analyseres prøverne fra test- og kontrolenhedernes udløb mindst én gang om ugen, for så vidt angår ammoniak og/eller nitrit samt nitrat.

50. Alle analyser gennemføres så hurtigt som muligt, især målinger af nitrogen. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4 °C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring (f.eks. 10 ml/l af en opløsning på 400 g/l af svovlsyre) eller tilsætning af et hensigtsmæssigt toksisk stof (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l-opløsning af kviksølv (II)-chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

*Kobling af testenheder*

51. Hvis kobling (tillæg 3) anvendes, skal der dagligt udveksles den samme mængde aktiveret slam (150-1 500 ml for beluftningstanke med 3 l væske) mellem testenhedens beluftningstank og kontrolenhedens beluftningstank. Hvis testkemikaliet adsorberer kraftigt til slammet, er det kun separatorernes svømmelag, der skal skiftes. I begge tilfælde skal der benyttes en korrektionsfaktor for at beregne testresultaterne (afsnit 55).

DATA OG RAPPORTERING

**Behandling af resultater**

52. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikaliet for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

hvor

$D_t$ = % eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

$C_s$ = DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikaliet, fortrinsvis anslået ud fra stamopløsningen (mg/l)

$E$ = målt DOC- eller COD-værdi i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

$E_o$ = målt DOC- eller COD-værdi i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l)

53. Graden af DOC- eller COD-eliminering af det organiske materiale i kontrolenheden er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af det aktiverede slam i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

hvor

$D_B$ = % eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden på tidspunktet t

$C_M$ = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløbet (mg/l)

▼M4

Beregn evt. den procentvise eliminering af DOC eller COD fremkaldt af det organiske materiale plus testkemikaliet i testenheden ved hjælp af ligningen:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

hvor

$D_T$ = % eliminering af DOC eller COD i samlet testindløb

$C_T$ = DOC eller COD af samlet testindløb eller beregnet ud fra stamopløsning (mg/l)

54. Beregn elimineringen af testkemikaliet målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

hvor

$D_{ST}$ = % primær eliminering af testkemikalie på tidspunktet t

$S_i$ = målt eller estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

$S_e$ = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

55. Hvis der er benyttet koblet tilstand, skal der kompenseres for fortyndingen af testkemikaliet i beluftningstanken som følge af slamudskiftning ved hjælp af en korrektionsfaktor (se tillæg 3). Hvis der er benyttet en gennemsnitlig hydraulisk retentionstid på seks timer, og halvdelen af volumenet af det aktiverede slam er udskiftet i beluftningstanken, skal de fastsatte daglige elimineringsværdier ($D_t$, afsnit 52) korrigeres for at opnå en korrekt elimineringsgrad, $D_{tc}$, af testkemikaliet ved hjælp af ligningen:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

**Angivelse af testresultater**

56. Indtegn den procentvise eliminering $D_t$ (eller $D_{tc}$) og eventuelt $D_{st}$ i forhold til tiden (se tillæg 2). Ud fra formen på testkemikaliets elimineringskurve (i sig selv eller som DOC) kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocessen.

*Adsorption*

57. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikaliet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikaliet sandsynligvis ved adsorption til de aktiverede faststoffer i slam. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie ved hjælp af specifikke analyser. Sædvanligvis forbliver DOC-elimineringen af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie på en eller anden måde kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikaliet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

▼M4

*Lag-fase*

58. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de nedbrydende bakterier næsten uden eliminering af testkemikaliet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen indledes, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

*Plateaufase*

59. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Plateaufasen bør vare mindst tre uger og have ca. 15 målte gyldige værdier.

*Middelelimineringsgrad for testkemikalie*

60. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne ($D_t$) for testkemikaliet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver den graden af eliminering af testkemikaliet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien.

*Eliminering af organisk materiale*

61. Indtegn procentdelen af eliminering af DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolenheden ($D_B$) i forhold til tiden. Angiv middelgraden af eliminering på samme måde som for testkemikaliet (afsnit 60).

*Indikation for bionedbrydning*

62. Hvis testkemikaliet ikke tydeligt adsorberes til det aktiverede slam, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 58 og 59), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripning), skal de adsorberede testkemikalier analyseres, eller yderligere statiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indicerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse [kapitel C.4 D, E og F i dette bilag (6)], test med måling af kuldioxidproduktion [kapitel C.4 C i dette bilag (6)] eller ISO Headspace-metoden (18), der benytter et præeksponeret inokulum fra simuleringstesten. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikaliet er målt, indicerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

*Testresultaternes validitet*

63. Oplysninger om den normale biologiske nedbrydningsproces af inokulum fås, når elimineringsgraden af det organiske materiale (afsnit 53) i kontrolenheden fastlægges. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering i kontrolenhederne er > 80 % efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.

▼M4

64. Hvis der er benyttet et let biologisk nedbrydeligt kemikalie (reference), bør graden af bionedbrydning ($D_t$, afsnit 52) være > 90 %.

65. Hvis testen gennemføres under nitrificerende forhold, bør middelkoncentrationen i udløb være < 1 mg/l ammoniak-N og < 2 mg/l nitrit-N.

66. Hvis disse kriterier (afsnit 63-65) ikke opfyldes, gentages testen ved hjælp af et inokulum fra en anden kilde, hvorefter et referencekemikalie testes, og alle forsøgsprocedurer kontrolleres.

**Testrapport**

67. Testrapporten skal indeholde følgende:

*Testkemikalie:*

— identifikationsdata

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

*Testbetingelser:*

— typen af testsystem; evt. modificeringer for test af uopløselige og flygtige kemikalier

— typen af organisk materiale

— art og andel af industrispildevand i spildevandet, hvis kendt

— inokulum, art og prøvetagningssted(er), koncentration og evt. forkonditionering

— stamopløsning af testkemikalie: DOC- og TOC-indhold; tilberedning i tilfælde af suspension; anvendt testkoncentration; årsager, hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; evt. ændringer

— gennemsnitlig slamalder og gennemsnitlig hydraulisk retentionstid, slamoverløbsmetode, metoder til afhjælpning af fyldning, tab af slam osv.

— anvendte analyseteknikker

— testtemperatur

— kvaliteter af slamfyld, slamvolumenindeks (SVI), faste stoffer, der er suspenderet (MLSS)

— enhver afvigelse fra standardprocedurer og alle omstændigheder, der kan have påvirket resultaterne.

*Testresultater:*

— alle målte data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur, iltkoncentration, suspenderede stoffer og N-kemikalier, hvis det er relevant)

— alle beregnede værdier af $D_t$ (eller $D_{tc}$), $D_B$ og $D_{St}$ opstillet i tabelform og elimineringskurver

— oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikaliet og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet

— diskussion af resultater.

▼M4

*LITTERATUR:*


(1) Swisher RD (1987). »Surfactant Biodegradation«, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 s.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA og King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, Det Forenede Kongerige.

(4) Painter HA og King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(7) Kapitel C.12 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — modificeret SCAS-test.

(8) Kapitel C.19 i dette bilag, Bestemmelse af adsorptionskoefficienten ($K_{OC}$) i jord og i kloakslam med HPLC (high performance liquid chromatography).

(9) Gerike P og Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P og Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA og Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. s 113-138, i: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revideret 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium — activated sludge simulation test.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK og Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G og Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Water Quality — Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

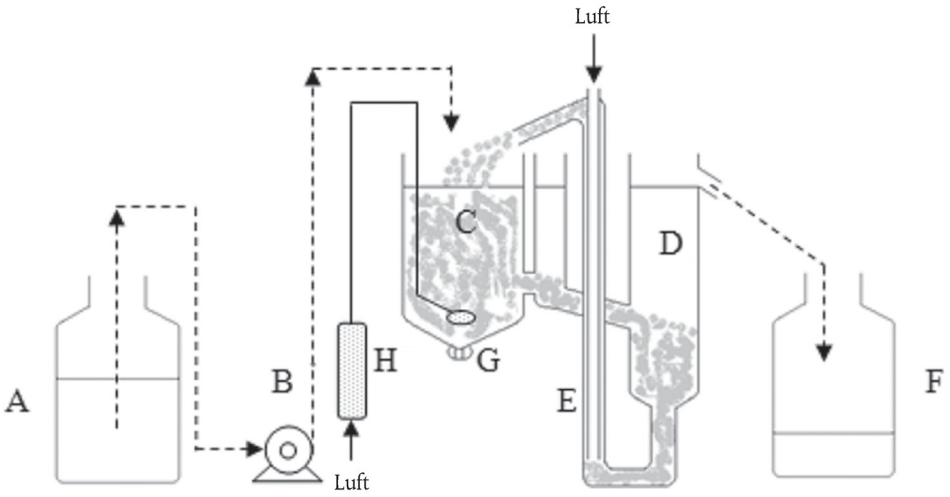
▼**M4**

*Tillæg 1*

*Figur 1*

**Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed**

Husmann-enhed

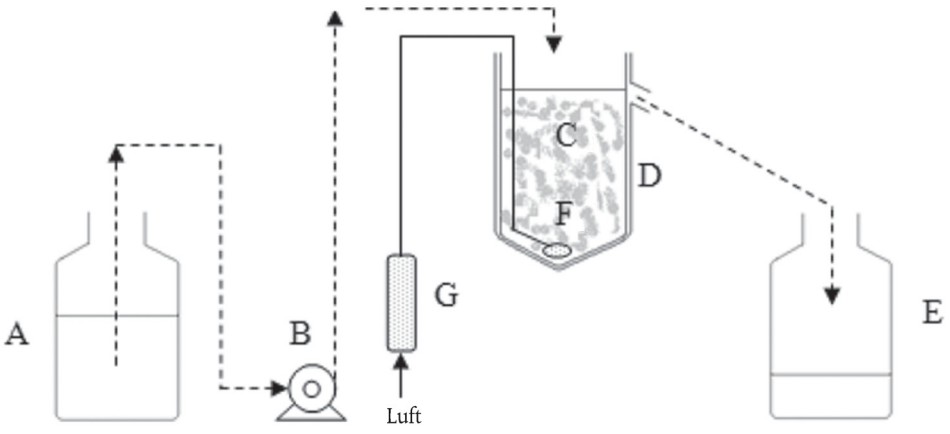



A. Opbevaringstank
B. Doseringspumpe
C. Beluftningskammer (kapacitet: 3 l)
D. Sedimentationsbeholder
E. Trykluftpumpe
F. Opsamlingstank
G. Beluftningsanordning
H. Flowmeter

*Figur 2*

**Udstyr til vurdering af bionedbrydelighed**

Porøse krukker

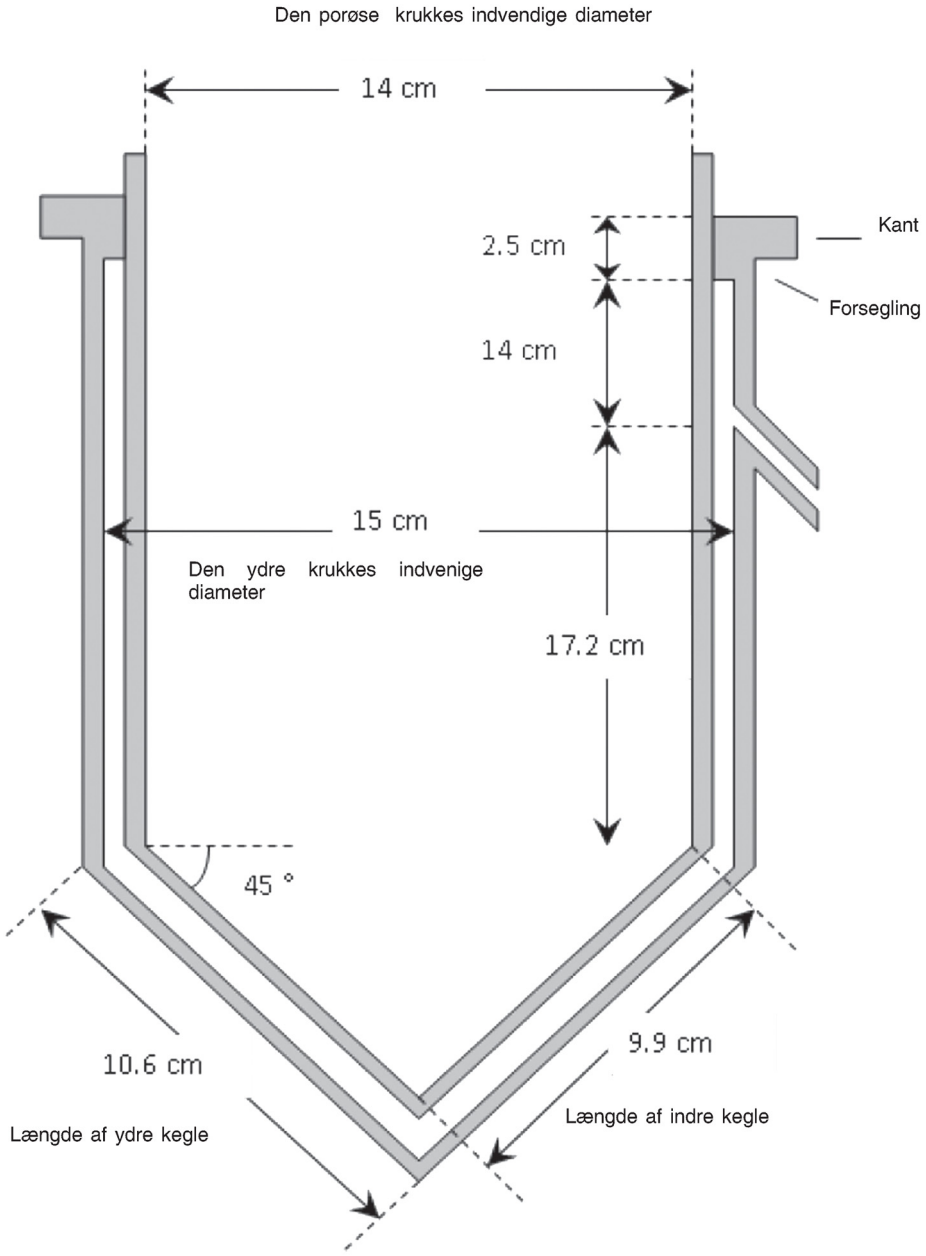



A. Opbevaringstank
B. Doseringspumpe
C. Porøs beluftningstank
D. Ydre tæt beholder
E. Opsamlingstank
F. Diffuser
G. Flowmeter

▼**M4**

*Figur 3*

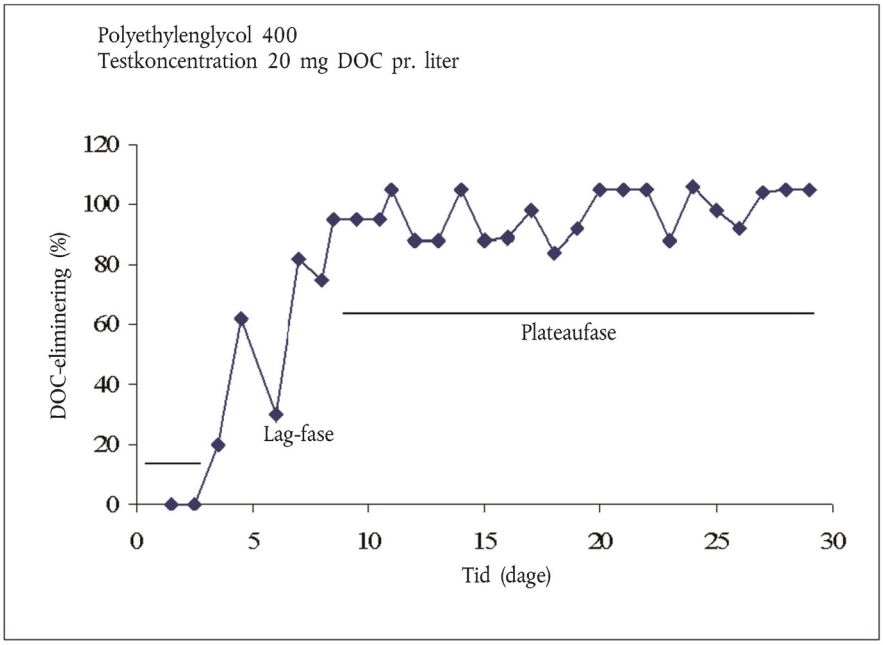
**Porøs krukke som beluftningstank – 3 l**



▼**M4**

*Tillæg 2*

**Eksempel på en elimineringskurve**



▼M4

*Tillæg 3*

[TIL ORIENTERING]

KOBLING AF TESTENHEDER

For at forsøge at udligne de mikrobielle populationer i slam i en testenhed, der tilføres spildevand og et testkemikalie, og i en kontrolenhed, der kun tilføres spildevand, blev der indført en daglig udskiftning af slam (1). Proceduren kaldes kobling, og metoden er kendt som koblede enheder. Kobling blev i starten udført ved hjælp af aktiverede slamenheder (Husmann), men det anvendes også i forbindelse med porøse krukker (2) (3). Der er ikke konstateret væsentlige forskelle i resultaterne mellem ikke-koblede og koblede enheder, hverken med Husmann-enheder eller porøse krukker, så der opnås ingen fordel ved at bruge tid og energi på at koble enhederne.

Udveksling af slam kan give indtryk af en ret omfattende eliminering, idet nogle af testkemikalierne overføres, og koncentrationerne af testkemikaliet i test- og kontroludløbet bliver næsten ens. Der skal derfor anvendes korrektionsfaktorer, som afhænger af den andel, der udskiftes, og den hydrauliske middelretentionstid. Der er offentliggjort nærmere oplysninger om beregningen (1).

Beregn den korrigerede DOC- eller COD-elimineringsgrad ved hjælp af den generelle formel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

hvor

$D_{tc}$ = korrigeret % DOC- eller COD-eliminering

$D_t$ = konstateret % DOC- eller COD-eliminering

a = udskiftningens andel af de aktiverede slamenheders volumen

r = gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (t)

Eksempel: Hvis halvdelen af beluftningstankens volumen udskiftes (a = 0,5), og den gennemsnitlige hydrauliske retentionstid er seks timer, anvendes følgende korrigerende formel:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

*LITTERATUR*

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA og Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113-138. I: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, Det Forenede Kongerige.

▼M4

*Tillæg 4*

EVALUERING AF HÆMNINGEN AF DET AKTIVEREDE SLAM

**Proces med testkemikalier**

1. Visse kemikalier (eller spildevand) bliver muligvis ikke nedbrudt eller elimineret i simuleringstesten, og de kan endog have en hæmmende effekt på slammets mikroorganismer. Andre kemikalier nedbrydes biologisk ved lave koncentrationer, men er hæmmende ved højere koncentrationer (hormese). Der kan være påvist hæmmende effekter på et tidligere stadium, eller det kan være bestemt ved hjælp af en toksicitetstest, hvor der er anvendt et inokulum, der svarer til eller er identisk med det, der blev anvendt i simuleringstesten (1). Eksempler på sådanne metoder er hæmning af iltoptagelse [kapitel C.11 i dette bilag (2) og ISO 8192(3)] eller hæmning af vækst af slamorganismer [ISO 15522 (4)].

2. I simuleringstesten vil enhver hæmning vise sig ved, at forskellen i opløst organisk kulstof (DOC) eller kemisk iltforbrug (COD) mellem udløbet fra testbeholderen og udløbet fra kontrollen er større end det DOC, der er tilsat som testkemikalie. Udtrykt på en anden måde vil den procentvise eliminering af DOC (og det biokemiske iltforbrug (BOD), COD og/eller $NH^{+}_{4}$) af det organiske materiale blive reduceret ved behandling i kraft af tilstedeværelsen af testkemikaliet. Hvis det sker, gentages testen, hvor koncentrationen af testkemikaliet reduceres, indtil der nås et niveau, hvor der ikke sker nogen hæmning, og måske reduceres yderligere, indtil testkemikaliet er biologisk nedbrudt. Hvis testkemikaliet (eller spildevandet) imidlertid har negative virkninger på processen ved alle testede koncentrationer, tyder det på, at kemikaliet er svært og muligvis umuligt at behandle biologisk. Det er dog værd at gentage testen med aktiveret slam fra en anden kilde og/eller underkaste slammet en langsommere akklimatisering.

3. Hvis testkemikaliet omvendt elimineres biologisk i første forsøg i simuleringstesten, skal koncentrationen forøges, hvis der skal indsamles viden om, hvorvidt kemikaliet kan være hæmmende.

4. Når man forsøger at bestemme grader af hæmning, skal man være opmærksom, at den aktiverede slampopulation kan undergå forandringer, så mikroorganismerne over tid kan udvikle en tolerance over for et hæmmende kemikalie.

5. Beregning af hæmningsgrad:

   Den overordnede procentvise eliminering $R_o$, af BOD, DOC, COD osv., kan for test- og kontrolenheder beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   hvor:

   I = indløbets koncentration af BOD, DOC, COD mv. i forbindelse med test- eller kontrolbeholdere (mg/l)

   E = udløbets koncentrationer (mg/l).

   I og E skal korrigeres for DOC, der skyldes testkemikaliet i testenhederne. Ellers vil beregningerne af den procentvise hæmning ikke blive korrekt.

▼**M4**

Graden af hæmning forårsaget af tilstedeværelsen af testkemikaliet kan beregnes ved hjælp af ligningen:

$$\% \text{ hæmning} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

hvor:

$R_c$ = procentvis eliminering i kontrolbeholderne

$R_t$ = procentvis eliminering i testbeholderne.

*LITTERATUR*

(1) Reynolds L et al. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.

(3) ISO 8192 (2007) Water quality — Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.

(4) ISO 15522 (1999) Water Quality — Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

*Tillæg 5*

**Testkemikalier, der er tungtopløselige i vand — flygtige kemikalier**

**Kemikalier, der er tungtopløselige i vand**

Der er tilsyneladende kun offentliggjort enkelte rapporter om test af vandopløselige og uopløselige kemikalier i forbindelse med spildevandsrensning (1) (2) (3).

Der findes ingen enkeltstående metode til dispergering af testkemikalier, der kan benyttes på alle uopløselige kemikalier. To af de fire metodetyper, der er beskrevet i ISO 10634 (4), kan muligvis bruges til at dispergere testkemikalier med henblik på simuleringstest. Det drejer sig om brug af emulgeringsmidler og/eller ultralyd. Det skal godtgøres, at den resulterende dispergering er stabil i perioder på mindst 24 timer. Velstabiliserede dispergeringer, der etableres under konstant omrøring i en beholder (afsnit 38), skal derefter overføres til en beluftningstank, der holdes adskilt fra husholdningsspildevand (eller syntetisk spildevand).

Hvis dispergeringerne er stabile, undersøges det, hvordan testkemikaliet kan bestemmes i dispergeret form. Det er ikke sandsynligt, at DOC vil være velegnet. Der skal derfor etableres en specifik analysemetode for testkemikaliet, som kan anvendes på udløb, faststoffer i udløb og aktiveret slam. Testkemikaliets skæbne i simuleringen af processen for aktiveret slam bestemmes derefter i flydende og faste faser. Derefter fastsættes en »massebalance« med henblik på at afgøre, om testkemikaliet er blevet biologisk nedbrudt. Det indicerer dog kun den primære biologiske nedbrydning. Påvisning af ultimativ biologisk nedbrydning sker ved at anvende af en respirometertest for let biologisk nedbrydelighed (kapitel C.4 i dette bilag (5) C, F eller D), hvor inokulumslam eksponeres for testkemikaliet i simuleringstesten.

**Flygtige kemikalier**

Udførelsen af simuleringer af spildevandsrensning på flygtige kemikalier er både kontroversiel og problematisk. Ligesom for testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, er der offentliggjort meget få rapporter, der beskriver simuleringstest af flygtige kemikalier. En konventionel type apparatur til fuldstændig opblanding tilpasses ved at forsegle beluftnings- og sedimentationstankene, måle og styre luftstrømmen ved hjælp af flowmetre og lede den udgangsgas gennem udskillere med henblik på at indsamle flygtigt organisk materiale. I nogle tilfælde benyttes en vakuumpumpe til at suge udgangsgassen gennem en »kold« udskiller eller en udsugningsudskiller med Tenax og silicagel med henblik på gaskromatografiske analyser. Testkemikaliet i udskilleren kan bestemmes analytisk.

Testen udføres i to etaper. Først kører enhederne uden slam, men hvor syntetisk spildevand og testkemikaliet pumpes ind i beluftningstanken. Prøver fra indløb, udløb og udgangsgas indsamles og analyseres for testkemikaliet i et par dage. Ud fra de indsamlede data kan den procentdel ($R_{vs}$) af testkemikaliet, der strippes fra systemet, beregnes.

Derefter gennemføres den normale biologiske test (med slam) under samme driftsbetingelser som stripningsundersøgelsen. Der udføres ligeledes DOC- eller COD-målinger for at kontrollere, at enhederne fungerer effektivt. Der udføres lejlighedsvise analyser for at bestemme testkemikaliet i indløb, udløb og udgangsgas i den første del af testen. Efter akklimatisering gennemføres hyppigere analyser. Ud fra steady state-data beregnes procentdelen af den eliminering af testkemikaliet fra væskefasen, der sker som følge af alle processer ($R_T$) (fysisk og biologisk), og andelen af ($R_V$), der er strippes fra systemet.

▼M4

Beregning:

a) I den ikke-biologiske test beregnes procentdelen ($R_{VP}$) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

hvor

$R_{VP}$ = eliminering af testkemikalie ved fordampning (%)

$S_{VP}$ = testkemikalie opsamlet i udskiller udtrykt som tilsvarende koncentration i væskefasen (mg/l)

$S_{IP}$ = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

b) I den biologiske test beregnes procentdelen ($R_V$) af det testmateriale, der strippes fra systemet, ved hjælp af ligningen:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

hvor

$R_V$ = eliminering af testkemikalie ved fordampning i biologisk test (%)

$S_V$ = testkemikalie opsamlet i udskiller i biologisk test udtrykt som tilsvarende koncentration i det flydende indløb (mg/l)

$S_I$ = koncentration af testkemikalie i indløb (mg/l).

c) I den biologiske test beregnes den procentdel ($R_T$) af testkemikaliet, der fjernes af alle processer, ved hjælp af ligningen:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

hvor

$S_E$ = koncentration af testkemikalie i det (flydende) udløb (mg/l).

d) Den procentdel ($R_{BA}$), der fjernes ved bionedbrydning plus adsorption, beregnes ved hjælp af ligningen:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Der udføres separate test for at bestemme, om testkemikaliet er adsorberet. Hvis det er tilfældet, skal der foretages yderligere korrektion.

e) En sammenligning mellem den andel af testkemikalie, der strippes fra de biologiske ($R_v$) og de ikke-biologiske testsystemer ($R_{vp}$), viser den generelle virkning, som biologisk behandling har på emissionen af testkemikaliet i atmosfæren.

*Eksempel*: Benzen

Slamretentionstid = 4 dage

Syntetisk spildevand: retentionstid = 8 timer

$S_{IP}$ = $S_I$ = 150 mg/l

$S_{VP}$ = 150 mg/l ($S_{EP}$ = 0)

$S_V$ = 22,5 mg/l

$S_E$ = 50 µg/l

▼**M4**

Således …

$R_{VP}$ = 100 %, $R_V$ = 15 %

$R_T$ = 100 % og $R_{BA}$ = 85 %.

Benzen anses derfor ikke til at blive adsorberet til slam.

*LITTERATUR*

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(5) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

▼M4

*Tillæg 6*

**Virkninger af slamretentionstid (SRT) på mulighederne for at behandle kemikalier**

INDLEDNING

1. Den metode, der beskrives i selve teksten, har til formål at afdække, om de testede kemikalier (normalt kemikalier, der er inhærent biologisk nedbrydelige, men ikke let biologisk nedbrydelige) kan nedbrydes biologisk inden for de rammer, der eksisterer i større spildevandsanlæg. Resultaterne udtrykkes som procentvis eliminering og procentvis bionedbrydning. Driftsforholdene i aktivslamenhederne og valget af indløb giver mulighed for temmelig store variationer i koncentrationen af testkemikaliet i udløbet. Testene udføres ved kun én nominel koncentration af slamfaststoffer eller én nominel slamretentionstid (SRT), og de beskrevne slamoverløbssystemer kan bevirke, at SRT-værdien varierer betydeligt i løbet af testen, både fra dag til dag og i løbet af dagen.

2. I denne variant (1) (2) holdes SRT inden for meget snævrere grænser i løbet af hver periode på 24 timer (på samme måde som i stort forhold), hvilket fører til en mere konstant koncentration i udløb. Det anbefales at bruge husholdningsspildevand, idet det giver mere konsistente og højere procentvis eliminering. Virkningerne af en række SRT-værdier undersøges, og i en mere detaljeret undersøgelse kan virkningerne af forskellige temperaturintervaller på forskellige udløbs koncentration bestemmes.

3. Der er endnu ikke generel enighed om de anvendelige kinetiske modeller, når kemikalier bionedbrydes i forbindelse med spildevandsrensning. Monod-modellen for bakteriel vækst og substratudnyttelse blev valgt (1) (2) til brug på de indsamlede data, idet metoden var beregnet til kun at blive brugt på kemikalier, der var produceret i store mængder, og som resulterede i spildevandskoncentrationer over 1 mg/l. Validiteten af den forenklede model og de angivne beregninger blev bekræftet ved hjælp af en serie alkoholethoxylater med varierende grader af primær bionedbrydelighed (2) (3).

*Bemærk:* Denne variantmetode ligger tæt op ad teksten til denne testmetode C.10-A, og det er kun de afvigende oplysninger, der herefter angives.

TESTENS PRINCIP

4. Enheder med porøse krukker til aktiveret slam, som er beregnet til at lette (næsten) kontinuerligt overløb af blandet væske, således at slamretentionstiden (SRT eller $\theta_s$) kan styres meget præcist, anvendes i ikke-koblet tilstand over et interval af SRT'er og evt. et interval af temperaturer. Retentionstiden er normalt 2-10 dage, og temperaturen ligger mellem 5 og 20 °C. Spildevandet, helst husholdningsspildevand, tilsættes sammen med en opløsning af testkemikaliet separat til enhederne i intervaller for at opnå den krævede retentionstid for spildevandet (3-6 timer) og den krævede koncentration af testkemikaliet i indløbet. Kontrolenheder, der ikke tilføres testkemikalier, kører parallelt med henblik på sammenligning.

5. Andre former for apparatur kan benyttes, men der skal udvises stor omhu for at opnå effektiv styring af SRT. Hvis der anvendes anlæg, som omfatter en sedimenteringsenhed, skal der f.eks. tages højde for tab af faststoffer via anlæggets udløb. Endelig skal der også tages særlige forholdsregler for at undgå fejl forårsaget af variationer i mængden af slam i sedimenteringsenheden.

▼M4

6. Enhederne drives ved hvert af de valgte sæt betingelser. Når ligevægtstilstanden er nået, opnås de gennemsnitlige steady state-koncentrationer af testkemikaliet i udløbet og evt. DOC i løbet af en periode på ca. tre uger. Ud over at vurdere den procentvise eliminering af testkemikaliet og evt. DOC udtrykkes forholdet mellem driftsforholdene i et anlæg og koncentrationen i udløbet grafisk. På den baggrund kan tentative kinetiske konstanter beregnes, og de betingelser, hvorunder testkemikaliet kan behandles, kan forudsiges.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

7. Kapitel C.10 A, afsnit 12 og 13, finder anvendelse.

TÆRSKELVÆRDIER

8. Kapitel C.10 A, afsnit 14 og 15, finder anvendelse.

REFERENCETESTKEMIKALIE

9. Kapitel C.10 A, afsnit 16, finder anvendelse.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

10. Kapitel C.10 A, afsnit 17 og 18, finder anvendelse.

BESKRIVELSE AF METODEN

**Apparatur**

11. En velegnet enhed er det modificerede system med porøse krukker (tillæg 6.1). Det består af en indvendig beholder (eller foring) fremstillet af porøst polypropylen med en tykkelse på 3,2 mm og en porestørrelse på ca. 90 μm. Samlingen er stumpsvejset. (Det giver en mere robust enhed end den, der er beskrevet i afsnit 21 i dette kapitel, C.10 A.) Foringen er indsat i en tæt ydre beholder af polyethylen, der består af to dele: en cirkelrund fod, hvori der er boret huller til to luftslanger og en slange til slamoverløb, samt en påmonteret cylinder, der skrues fast på foden, og som er forsynet med et udløb, der er placeret, så der opnås et bestemt volumen (3 l) i den porøse krukke. En af luftslangerne er udstyret med en diffuser-sten, og den anden afslutter åbent og er placeret vinkelret på stenen i krukken. Dette system frembringer turbulens, der sikrer, at krukkens indhold blandes effektivt, og at der opnås koncentrationer af opløst ilt over 2 mg/l.

12. Et passende antal enheder opbevares ved kontrollerede temperaturer i intervallet fra 5-20 °C (± 1 °C) enten i vandbad eller i lokaler med konstant rumtemperatur. Ved hjælp af pumper tilføres opløsningen af testkemikaliet og bundfældet spildevand til beluftningstankene i de angivne doser (0-1,0 ml/min. og 0-25 ml/min.), og ved hjælp af en tredje pumpe fjernes affaldsslam fra beluftningstankene. Den nødvendige meget lave strømningshastighed for affaldsslam opnås ved hjælp af en pumpe, der indstilles til en højere hastighed og kun kører i intervaller styret af en timer. Pumpen kører f.eks. pumpen i 10 sekunder pr. minut, hvor den pumper med 3 ml/min., hvilket giver en strømningshastighed for affaldsslam på 0,5 ml/min.

*Filtreringsapparat eller centrifuge*

13. Kapitel C10 A, afsnit 23, finder anvendelse.

*Analyseudstyr*

14. Kapitel C.10 A, afsnit 24, finder anvendelse.

*Vand*

▼M4

15. Kapitel C.10 A, afsnit 25 og 26, finder anvendelse.

*Organisk materiale*

16. Kapitel C.10 A, afsnit 27, finder anvendelse.

*Syntetisk spildevand*

17. Kapitel C.10 A, afsnit 28, finder anvendelse.

*Husholdningsspildevand*

18. Kapitel C.10 A, afsnit 29, finder anvendelse.

*Aktiveret slam*

19. Kapitel C10 A, afsnit 30, finder anvendelse.

*Stamopløsninger af testkemikaliet*

20. Kapitel C.10 A, afsnit 31 og 32, finder anvendelse.

FREMGANGSMÅDE

*Fremstilling af inokulum*

21. Kapitel C.10 A, kun afsnit 34, finder anvendelse — brug aktiveret slam (ca. 2,5 g/l).

*Antal testenheder*

22. Til en enkel test, f.eks. måling af den procentvise eliminering, kræves kun en enkelt SRT. Hvis der skal indsamles data til beregning af tentative kinetiske konstanter, kræves der dog fire eller fem SRT-værdier. Der vælges normalt værdier mellem 2 og 10 dage. I praksis udføres en test med fire eller fem SRT'er samtidig ved én temperatur. Ved udvidede forsøg benyttes de samme SRT-værdier eller måske et andet interval af værdier ved andre temperaturer inden for et interval fra 5-20 °C. Ved primær bionedbrydning (hovedanvendelse) kræves normalt kun én enhed pr. sæt betingelser. For at opnå den ultimative biologiske nedbrydelighed kræves en kontrolenhed for hvert sæt betingelser, og denne enhed tilføres spildevand, men ikke testkemikalie. Hvis testkemikaliet anses for at være til stede i det brugte spildevand, skal der anvendes kontrolenheder i forbindelse med vurderingen af den primære biologiske nedbrydning, hvorefter beregningerne korrigeres som nødvendigt.

*Dosering af organisk materiale og testkemikalie*

23. Kapitel C.10 A, afsnit 36-39, finder anvendelse. Det bør dog bemærkes, at opløsningen af testkemikalier doseres separat, og at der benyttes forskellige overløbsprocenter for slam. Strømningshastigheder for indløb, udløb og slamoverløb overvåges og justeres eventuelt inden for ± 10 % f.eks. to gange om dagen. Hvis der opstår problemer i forbindelse med analysemetoderne, når der benyttes husholdningsspildevand, kan testen gennemføres med syntetisk spildevand. Det skal dog sikres, at de forskellige medier giver sammenlignelige kinetiske data.

*Håndtering af enheder til aktiveret slam*

24. Kapitel C.10 A, afsnit 40 til 43, finder anvendelse. SRT kontrolleres dog kun ved »konstant« slamoverløb.

*Prøvetagning og analyse*

25. Kapitel C.10 A, afsnit 44-50, finder anvendelse. Dog skal koncentrationen af testkemikaliet og evt. DOC bestemmes. COD bør ikke anvendes.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

**Behandling af resultater**

26. Kapitel C.10 A, afsnit 52-54, finder anvendelse.

**Angivelse af testresultater**

27. Kapitel C.10 A, afsnit 56-62, finder anvendelse.

**Beregning af kinetiske konstanter**

28. Det er mere realistisk at anføre testkemikaliets gennemsnitlige steady state-koncentration i udløbet og beskrive, hvordan denne værdi varierer med driftsforhold, end at anføre den procentvise primære biologiske nedbrydning. Dette kan gøres ved hjælp af ligningen (6) i tillæg 6.2, der kan give værdier til $K_S$, $\mu_m$ og $\theta_{SC}$, den kritiske slamretentionstid.

(Alternativt kan de omtrentlige værdier for $K_S$ og μm fås ved hjælp af et simpelt computerprogram, som tilpasser den teoretiske kurve, der er beregnet ud fra ligning 2 (tillæg 6.2), til de målte forsøgsværdier. Selv om en given løsning ikke vil være unik, kan der fås en brugbar tilnærmelse af $K_S$ og $\mu_m$.)

**Resultaters variabilitet**

29. Det er velkendt, at der opnås variable værdier for kinetiske parametre for forskellige kemikalier. Det antages, at de forhold, som slammet er udviklet under, og de aktuelle betingelser i testen (som i afsnit 5 og i andre testforløb) i væsentlig grad påvirker de resulterende værdier. Et af aspekterne ved denne variabilitet er blevet behandlet af Grady et al. (4), der har foreslået, at udtrykkene »extant« og »intrinsic« burde anvendes i forbindelse med to ekstreme forhold, der repræsenterer grænserne for den fysiologiske tilstand, en dyrkning kan opnå i forbindelse med et kinetisk eksperiment. Hvis tilstanden ikke må ændres under testen, afspejler de kinetiske parameterværdier de forhold i miljøet, hvorfra mikroorganismerne blev udtaget. Disse værdier kaldes »extant« eller i daglig tale »eksisterende«. Ved det andet ekstreme forhold, hvor testens betingelser går ud på at tillade den fulde udvikling af proteinsyntesesystemet og tillade den størst mulige vækstrate, kaldes de opnåede kinetiske parametre »intrinsic«, og de er kun afhængige af substratets tilstand og bakterietyperne i dyrkningen. Som en vejledning kan man tænke på, at »extant values« opnås ved at holde forholdet mellem koncentrationen af substrat og kompetente mikroorganismer ($S_o/X_o$) lavt, f.eks. 0,025, hvorimod der er tale om »intrinsic values«, når forholdet er højt, f.eks. mindst 20. I begge tilfælde skal $S_o$ være lig med eller større end den relevante værdi for Ks (halvmætningskonstanten).

30. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (5). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensningsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

*LITTERATUR:*

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

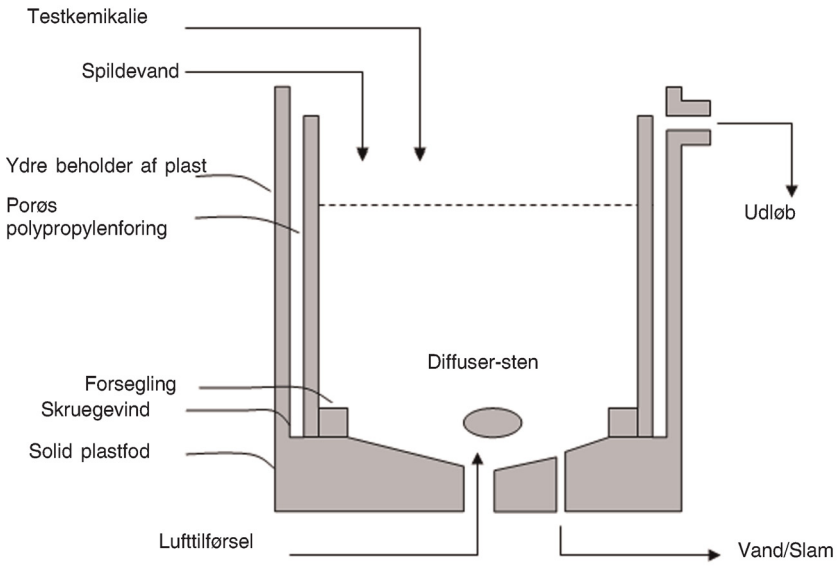
(4) Grady CPL, Smets BF og Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC-Europe, Bruxelles.

▼M4

*Tillæg 6.1*

**Porøs krukke med SRT-styring**



▼M4

*Tillæg 6.2*

**Beregning af kinetiske konstanter**

1. Når det antages, at Monod-kinetik gør sig gældende, og på baggrund af en massebalance af aktive faststoffer og substrat i det aktiverede slamsystem (1) kan der opnås følgende steady state-udtryk:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

eller

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

hvor:

$S_1$ = koncentration af substrat i udløb, (mg/l)

$K_S$ = halvmætningskonstant, den koncentration, hvor $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

$\mu$ = specifik vækstrate ($d^{-1}$)

$\mu_m$ = maksimumsværdi for $\mu_m$ ($d^{-1}$)

$K_d$ = specifik henfaldsrate for aktive faststoffer ($d^{-1}$)

$\theta_S$ = slammets gennemsnitlige retentionstid, SRT (d)

En undersøgelse af denne ligning fører til følgende konklusioner:

i) Udløbets koncentration er uafhængig af koncentrationen i indløbet ($S_0$). Derfor varierer den procentvise biologiske nedbrydning med indløbets koncentration, $S_0$.

ii) Den eneste parameter for anlægsstyring, der påvirker $S_1$, er slamretentionstiden, $\theta_S$.

iii) For en given koncentration i indløbet, $S_0$, vil der være en kritisk slamretentionstid:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

hvor:

$\theta_{SC}$ = kritisk slamretentionstid, under hvilken de kompetente mikroorganismer vaskes ud af anlægget.

iv) Da de andre parametre i ligning (2) er knyttet til vækstkinetik, vil temperaturen sandsynligvis påvirke substratniveauet i udløbet og den kritiske slamalder, dvs. at den slamretentionstid, der er nødvendig for at opnå en bestemt behandlingsgrad, stiger med faldende temperatur.

2. På baggrund af en massebalance af faststoffer i systemet med porøse krukker og forudsat, at faststofkoncentration i anlæggets udløb, $X_2$, er lav i forhold til koncentrationen i beluftningstanken, $X_1$, vil slamretentionstiden være

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

og

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

hvor:

V = beluftningstankens volumen (l)

$X_1$ = faststofkoncentration i beluftningstank (mg/l)

$X_2$ = faststofkoncentrationen i udløb, (mg/l)

$Q_0$ = gennemstrømningshastighed for indløb (l/d)

$Q_1$ = gennemstrømningshastighed for affaldsslam (l/d)

Derved kan slamretentionstiden styres ved enhver forudvalgt værdi ved at styre gennemstrømningshastigheden for affaldsslam, $Q_1$.

Konklusioner:

3. Testens hovedformål er derfor at kunne forudsige udløbets koncentration og dermed niveauerne af testkemikalie i det modtagende vand.

4. Ved at afsætte $S_1$ i forhold til $\theta_S$ kan den kritiske slamretentionstid, $\theta_{SC}$, nogle gange evalueres direkte, f.eks. kurve 3 i figur 1. Når dette ikke er muligt, kan $\theta_{SC}$ beregnes, sammen med omtrentlige værdier for $\mu_m$ og $K_S$, ved at afsætte $S_1$ i forhold til $S_1 \bullet \theta_S$.

En ændring af ligningen (1) giver

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Hvis $K_d$ er lille, bliver $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ og [5]:

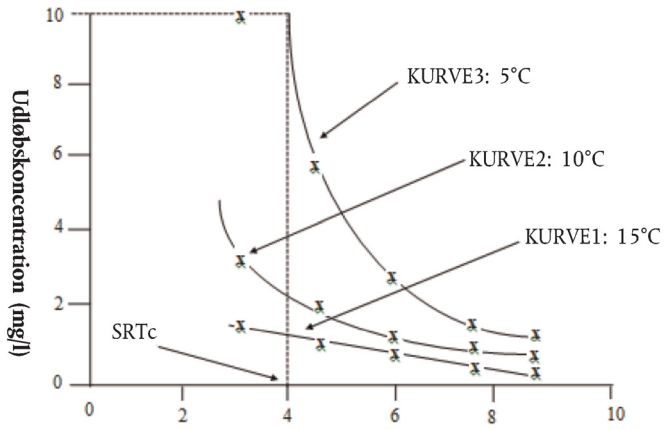
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Grafen skulle dermed blive en lige linje (se figur 2) af hældningen $1/\mu_m$ og skære $K_S/\mu_m$ — altså $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

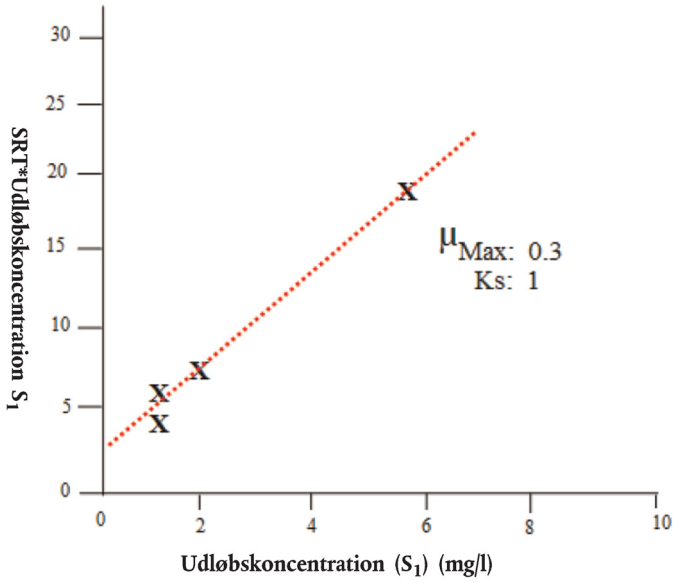
*Figur 1*

**Tre temperaturer; fem SRT'er**




*Figur 2*

**Regressionslinje SRT · $S_1$ over for $S_1$ ved T = 5 °C**




*Ordliste*:

Udløbskoncentration

Kurve.

▼M4

*Tillæg 7*

TEST VED LAVT (µg/l) KONCENTRATIONSOMRÅDE

1. Mange kemikalier er normalt til stede i vandmiljøet i meget lave koncentrationer (µg/l) — selv i spildevand. Ved disse koncentrationer fungerer de sandsynligvis ikke som primære substrater, der fremmer vækst. Der er større sandsynlighed for, at de nedbrydes som sekundære substrater uden vækst sideløbende med en række forskellige naturligt forekommende kulstofkemikalier. Nedbrydningen af sådanne kemikalier passer derfor ikke ind i den model, der er beskrevet i tillæg 6. Der findes mange modeller, der kan anvendes, og der kan anvendes flere modeller samtidig under de betingelser, der gælder i spildevandsrensningssystemer. Der kræves betydeligt mere forskning at belyse dette problem.

2. I mellemtiden kan den fremgangsmåde, der er beskrevet i selve teksten (kapitel C.10 A), følges, men kun i forbindelse med primær biologisk nedbrydelighed, hvor der er tale om passende lave koncentrationer (< 100 µg/l) og en valideret analysemetode. Den procentvise biologiske nedbrydning kan beregnes (se afsnit 54 i testmetoden), når blot der tages højde for de abiotiske processer (adsorption, flygtighed osv.). Et eksempel er den undersøgelse, der blev gennemført af Nyholm m.fl. (1) (2), der benyttede en firetimers cyklus i et fill and draw-system. De rapporterede om pseudo-førsteordenskonstanter for fem kemikalier, der blev tilsat syntetisk spildevand i en mængde fra 5 til 100 µg/l. I forbindelse med ultimativ biologisk nedbrydelighed kan der anvendes $^{14}$C-mærkede testkemikalier. En beskrivelse af dette ligger uden for omfanget af denne testmetode, idet der endnu ikke er fastlagt alment accepterede fremgangsmåder, selv om et forslag til en metode for ISO 14592 (3) indeholder en vejledning om brugen af $^{14}$C-mærkede kemikalier.

**SCAS-test**

3. Senere blev en enkel totrinstest foreslået (4) (5) (6). Metoden med semikontinuerligt aktiveret slam (SCAS) benyttes i kortvarige kinetiske test på prøver, der er udtaget fra SCAS-enhederne. SCAS-systemet kører med kendte værdier for slamoverløb (i modsætning til den oprindelige C.12-testmetode) og tilføres modificeret syntetisk spildevand som defineret af OECD eller husholdningsspildevand. Det syntetiske spildevand blev modificeret (på grund af en ændret pH-værdi og slammets dårlige sedimentationsevne) ved at tilføre fosfat som buffer, gærekstrakt, jernklorid (III), sporstoffer og salte, og dets COD blev forøget til ca. 750 mg/l ved at forøge koncentrationen af pepton og kødekstrakt. Enhederne kørte i en 24-timers cyklus: beluftning i 23 timer, slamoverløb, sedimentering, eliminering af supernatant (udløb) efterfulgt af tilsætning af syntetisk spildevand plus testkemikalie, op til 100 µg/l (dvs. ved ca. samme koncentration som i den kortvarige test). En gang om ugen udskiftes 10 % af den samlede mængde slam med frisk slam for at opretholde en afbalanceret mikrobiel population.

4. Koncentrationerne af testkemikaliet i starten og ved afslutningen af beluftningen måles, og testen fortsættes, indtil der opnås en konstant eliminering af testkemikaliet. Det kan tage fra en uge til flere måneder.

**Kortvarig test**

5. En kortvarig test (f.eks. 8 timer) gennemføres for at bestemme den (pseudo) første ordens kinetiske hastighedskonstant for henfaldet af testkemikaliet i aktiveret slam af kendte, men andre oprindelser og historikker. Der udtages slamprøver fra SCAS-reaktorerne — ved afslutningen af en beluftningsperiode, når koncentrationen af organisk substrat er lav — i løbet af et akklimatiseringsforsøg (afsnit 3 og 4). Med henblik på sammenligning kan slam også udtages fra en parallel SCAS-enhed, der ikke er eksponeret for testkemikaliet. Blandinger af slam og testkemikalie, der tilsættes i to

▼M4

eller flere koncentrationer i området 1-50 µg/l, beluftes uden tilførsel af syntetisk spildevand eller andre organiske substrater. Den tilbageværende mængde testkemikalie i opløsningen bestemmes med regelmæssige intervaller, f.eks. hver time afhængigt af kemikaliets nedbrydning, i en periode på højst 24 timer. Prøverne centrifugeres inden relevant analyse.

**Beregninger**

6. Data fra SCAS-enhederne anvendes til beregning af den procentvise eliminering af testkemikaliet (afsnit 54). En gennemsnitlig hastighedskonstant, $K_1$, (normaliseret med hensyn til koncentration af suspenderede faststoffer) kan beregnes ved hjælp af:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

hvor:

t = beluftningstid (23 timer)

$C_e$ = koncentration ved afslutning af beluftningsperiode (µg/l)

$C_i$ = koncentration ved start af beluftning (µg/l)

SS = koncentration af faststof i aktiveret slam (g/l)

7. I den kortvarige test afsættes den tilbageværende log %-koncentration i forhold til tid, og hældningen af den første del (10-50 % nedbrydning) af kurven svarer til $K_1$, (pseudo) første ordens konstant. Konstanten normaliseres med hensyn til koncentrationen af slamfaststoffer ved at dividere hældningen med koncentrationen af slamfaststoffer. Det rapporterede resultat skal også indeholde oplysninger om startkoncentrationer af testkemikaliet og de suspenderede faststoffer, slamretentionstid, slamtilførsel og kilde samt oplysninger om (evt.) præeksponering for testkemikaliet.

**Resultaters variabilitet**

8. Variabilitet og andre facetter ved bionedbrydningskinetik blev for nylig diskuteret i forbindelse med en SETAC-workshop (7). Disse forsøg — rapporterede og planlagte — vil give et klarere indblik i kinetikken i spildevandsrensningsanlæg og medvirke til at give en bedre forståelse af eksisterende data, ligesom de vil medvirke til mere relevante designs til fremtidige testmetoder.

*LITTERATUR*

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A og Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O og Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP og Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT og Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Miljøstyrelsen. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Miljø- og Energiministeriet, København.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop hos Port Sunlight, Det Forenede Kongerige. Eds. Hales, SG. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4.-6. sept. 1996. SETAC- Europe, Bruxelles.

▼M4

## C.10-B: Biofilm

INDLEDNING

1. Simuleringstest anvendes normal i forbindelse med kemikalier, der ikke har bestået en screeningstest for let bionedbrydelighed (kapitel C.4 A-F i dette bilag (9)), men som har bestået en test for iboende bionedbrydelighed. I enkelte tilfælde anvendes simuleringstest ligeledes i forbindelse med et kemikalie, som man ønsker flere oplysninger om, især kemikalier, der forekommer i store mængder, og normalt anvendes testen af aktiveret slam (C.10 A). Under visse omstændigheder kræves der dog specifikke oplysninger om, hvordan et kemikalie reagerer over for forskellige metoder til spildevandsrensning, som f.eks. biofilm, nedsivnings- eller nedrislingsfiltre, roterende biologiske kontaktorer og fluide bede. Der er udviklet forskellige former for apparatur til dette formål.

2. Gerike et al. (1) benyttede store nedsivningsfiltre i pilotanlægsstørrelse i sammenkoblet tilstand. Disse filtre var meget pladskrævende og krævede relativt store mængder spildevand eller syntetisk spildevand. Truesdale et al. (2) har beskrevet mindre filtre (diameter: 6 fod × 6 tommer), hvortil der blev tilført overfladeaktivt naturligt spildevand, men disse filtre var stadig ret pladskrævende. Der krævedes hele 14 uger til at udvikle en »moden« biofilm, og der krævedes yderligere 4-8 uger efter den første tilsætning af det overfladeaktive teststof, inden akklimatiseringen fandt sted.

3. Baumann et al. (3) udviklede et meget mindre filter, hvori der blev anvendt »polyester-fleece«, som var dyppet i aktiveret slam som det inaktive medie til at støtte biofilmen. Testkemikaliet blev anvendt som eneste kulstofkilde, og bionedbrydeligheden blev vurderet ud fra målinger af opløst organisk kulstof (DOC) i indløb og udløb og ud fra mængden af $CO_2$ i udgangsgassen.

4. En helt anden tilgang blev benyttet af Gloyna et al. (4), som opfandt den roterende rørreaktor. På den indvendige overflade af det roterende rør dyrkes en biofilm på det kendte overfladeareal ved passage af indløb tilført i toppen af røret, der er skråtstillet i en lille vinkel i forhold til vandret. Reaktoren er blevet brugt dels til at undersøge den biologiske nedbrydelighed af overfladeaktive stoffer (5) og dels til at undersøge den optimale tykkelse af biofilm og diffusionen gennem filmen (6). Forfatterne har videreudviklet reaktoren og modificeret den, så man kan bestemme mængden af $CO_2$ i udgangsgassen.

5. Den roterende rørreaktor er anerkendt af den britiske »Standing Committee of Analysts« som en standardmetode til vurdering af både den biologiske nedbrydelighed af kemikalier (7) og muligheder for spildevandsrensning og toksicitet i spildevand (8). Fordelene ved den metode, der beskrives her, er, at den er enkel, kompakt og reproducerbar, og at den kun kræver relativt små mængder af organisk materiale.

TESTENS PRINCIP

6. Syntetisk spildevand eller husholdningsspildevand sammen med testkemikalie, iblandet eller alene, tilføres den indvendige overflade af et langsomt roterende skråtstillet rør. På den indvendige overflade dannes et lag af mikroorganismer, der ligner dem, der findes på medier i biofiltre. Reaktorens driftsbetingelser vælges, så man opnår en passende eliminering af organisk stof og eventuelt oxidation af ammoniak.

▼M4

7. Udløbet fra røret opsamles, hvorefter det enten sedimenteres og/eller filtreres for organisk opløst kulstof (DOC) og/eller for testkemikalie ved hjælp af en specifik metode, inden det analyseres. Kontrolenheder, der ikke får tilført testkemikalier, kører parallelt under samme forhold med henblik på sammenligning. Forskellen mellem koncentrationerne af DOC i udløbet fra test- og kontrolenhederne antages at skyldes testkemikaliet og stoffets organiske metabolitter. Denne forskel sammenlignes med koncentrationen af det tilsatte testkemikalie (som DOC) for at beregne elimineringen af testkemikaliet.

8. Biologisk nedbrydelighed kan normalt skelnes fra biologisk adsorption ved omhyggelig undersøgelse af kurven for elimineringstid. Der kan normalt opnås bekræftelse ved at gennemføre en test for let biologisk nedbrydelighed (iltoptagelse eller kuldioxidproduktion) ved hjælp af et akklimatiseret inokulum, der er udtaget ved afslutningen af testen fra de reaktorer, der får tilført testkemikaliet.

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

9. Testkemikaliets renhed, vandopløselighed, flygtighed og adsorptionskarakteristik skal være kendt, for at resultaterne kan fortolkes korrekt.

10. Flygtige og tungtopløselige kemikalier kan ikke testes, medmindre der tages særlige forholdsregler (se tillæg 5 til kapitel C.10 A). Den kemiske struktur, eller i det mindste den empiriske formel, skal ligeledes være kendt, hvis man vil beregne de teoretiske værdier og/eller kontrollere parametrenes målte værdier, f.eks. teoretisk iltforbrug (ThOD), DOC.

11. Oplysninger om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer (se tillæg 4 til kapitel C.10 A) kan anvendes i forbindelse med valg af passende testkoncentrationer og kan være afgørende for korrekt fortolkning af lave værdier for bionedbrydning.

TÆRSKELVÆRDIER

12. Den primære biologiske nedbrydning af de overfladeaktive stoffer skulle oprindeligt nå op på 80 % eller mere, inden kemikaliet kunne markedsføres. Hvis værdien 80 % ikke opnås, kan denne simuleringstest (kontroltest) anvendes, og det overfladeaktive stof kan markedsføres, hvis over 90 % af det specifikke kemikalie er elimineret. For kemikalier er der generelt ikke tale om at bestå/dumpe, og derfor kan den opnåede værdi for fjernelse benyttes i forbindelse med omtrentlige beregninger af den sandsynlige koncentration i miljøet, der kan bruges i vurderinger af risici fra kemikalier. I en række forsøg med rene kemikalier viste den procentvise eliminering af DOC sig at være over 90 % i mere end tre fjerdedele og over 80 % i mere end 90 % af de kemikalier, der viste sig at have en signifikant værdi for biologisk nedbrydelighed.

REFERENCEKEMIKALIER

13. For at sikre korrekt udførelse af forsøget kan det være nyttigt med jævne mellemrum at teste referencekemikalier, hvis adfærd er velkendt. Sådanne kemikalier omfatter adipinsyre, 2-phenylphenol, 1-naphthol, diphensyre og 1-naphthoesyre.

FORSØGSRESULTATERNES REPRODUCERBARHED

14. Den relative standardafgivelse mellem test blev af et laboratorium i Det Forenede Kongerige målt til at være 3,5 % og mellem testene 5 % (7).

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

**Apparatur**

*Roterende rørreaktorer*

15. Apparaturet (se figur 1 og 2 i tillæg 8) består af en samling akrylrør, der hver måler 30,5 cm i længden og har en indvendig diameter på 5 cm. Rørene er anbragt på gummihjul, der er monteret på en metalramme. Hvert rør har en udvendig flange, ca. 0,5 cm dyb, der skal fastholde det på hjulene. Den indvendige overflade er gjort ru ved hjælp af groft ståluld, og der er en 0,5 cm dyb indvendig flange i rørets øverste ende (indløb) til at holde på væsken. Rørene er skråtstillede i en vinkel på ca. én grad i forhold til vandret for at opnå den nødvendige kontakttid, når testmediet ledes ind i et rent rør. Hjulene med gummidæk roteres ved hjælp af en langsom motor med variabel hastighed. Temperaturen i rørene styres ved at installere apparaturet i konstant rumtemperatur.

16. Ved at placere hvert enkelt rørreaktor inde i et lidt større lukket rør og gøre forbindelserne gastætte kan $CO_2$-udgangsgassen opsamles i en alkalisk opløsning til efterfølgende måling (6).

17. For hvert rør opbevares forsyning til 24 timer af et organisk materiale, evt. tilsat et testkemikalie, i en 20 l opbevaringsbeholder (A) (se figur 2). Opløsningen af testkemikalie kan evt. doseres separat. Tæt på bunden i hver opbevaringsbeholder er der en udgang, hvorfra der går et rørsystem af f.eks. silikonegummi via en slangepumpe (B) til et glas eller akrylrør, der går 2-4 cm ind i den øverste ende (tilløb) af det skrå rør (C). Udløb kan dryppe fra den nederste ende af det skrå rør og opsamles i en anden opbevaringsbeholder (D). Udløbet sedimenteres eller filtreres inden analyse.

*Filtreringsapparat eller centrifuge*

18. Apparatur til filtrering af prøver ved hjælp af membranfiltre med passende porøsitet (nominel åbningsdiameter 0,45 μm) til adsorption af organiske kemikalier med mindst mulig frigivelse af organisk kulstof. Hvis der benyttes filtre, som frigiver organisk kulstof, vaskes disse filtre omhyggeligt med varmt vand for at fjerne afgivet organisk kulstof. Alternativt kan der benyttes en centrifuge med en kapacitet på 40 000 $m/s^2$.

19. Analyseudstyr til bestemmelse af:

— DOC/samlet organisk kulstof (TOC) eller kemisk iltforbrug (COD)

— specifikt kemikalie (HPLC, GC osv.), hvis påkrævet

— pH, temperatur, syreindhold og alkalinitet

— ammoniak, nitrit og nitrat, hvis testene gennemføres under nitrificerende forhold.

*Vand*

20. Ledningsvand, der indeholder under 3 mg/l DOC.

21. Destilleret eller deioniseret vand, der indeholder under 2 mg/l DOC.

▼M4

*Organisk materiale*

22. Syntetisk spildevand, husholdningsspildevand eller en blanding heraf kan anvendes som organisk materiale. Det er påvist, at anvendelsen af husholdningsspildevand alene ofte medfører øget eliminering af DOC i procent (i aktiveret slam) og endda bionedbrydning af visse kemikalier, som ikke nedbrydes biologisk, når der anvendes syntetisk spildevand som defineret af OECD. Derfor anbefales brugen af husholdningsspildevand. Mål koncentrationen af DOC (eller COD) i alle nye batches med organisk materiale. Det organiske materiales aciditet eller alkalinitet bør være kendt. Det organiske materiale skal muligvis tilsættes en velegnet buffer (natriumhydrogencarbonat eller kaliumhydrogenfosfat), hvis mediets aciditet eller alkalinitet er lav, for at holde en pH-værdi på ca. 7,5 ± 0,5 i reaktoren i løbet af testen. Mængden af buffer og tidspunktet for, hvornår den skal tilsættes, afgøres i hvert enkelt tilfælde.

*Syntetisk spildevand*

23. Opløs i én liter ledningsvand: pepton: 160 mg; kødekstrakt: 110 mg; urinstof: 30 mg; vandfrit dikaliumhydrogenfosfat ($K_2HPO_4$): 28 mg; natriumchlorid (NaCl): 7 mg; calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$): 4 mg; magnesiumsulfatheptahydrat ($Mg_2SO_4.7H_20$): 2 mg. Dette eksempel på syntetisk spildevand som defineret af OECD giver en middel DOC-koncentration i indløbet på ca. 100 mg/l. Der kan også benyttes andre sammensætninger med ca. den samme DOC-koncentration, og som ligger tættere på rigtigt spildevand. Dette syntetiske spildevand kan fremstilles ved hjælp af destilleret vand i koncentreret form og opbevares ved ca. 1 °C i op til én uge. Fortynd efter behov med ledningsvand. (Dette materiale er ikke tilfredsstillende. Kvælstofkoncentrationen er f.eks. meget høj, og kulstofindholdet relativt lavt, men der er ikke foreslået en bedre løsning, bortset fra tilførsel af mere fosfat som buffer og ekstra pepton).

*Husholdningsspildevand*

24. Benyt frisk bundfældet spildevand, der indsamles dagligt fra et rensningsanlæg, der hovedsageligt modtager husholdningsspildevand. Det indsamles fra overløbskanalen på den primære sedimenteringstank eller fra indløbet til aktivslamanlægget, og det skal stort set være uden grove partikler. Spildevandet kan benyttes efter flere dages opbevaring ved ca. 4 °C, hvis det dokumenteres, at DOC (eller COD) ikke falder væsentligt (dvs. med mindre end 20 %) under opbevaringen. For at begrænse forstyrrelserne af systemet bør DOC (eller COD) af hver ny batch justeres inden brug, så der opnås en passende konstant værdi, f.eks. ved fortynding med ledningsvand.

*Smøremiddel*

25. Glycerol eller olivenolie kan bruges til smøring af rullerne i slangepumpen. Begge smøremidler kan bruges på rør af silikonegummi.

*Stamopløsninger af testkemikaliet*

26. I forbindelse med kemikalier, der er tilstrækkelig opløselige, fremstilles stamopløsninger i passende koncentrationer (f.eks. 1-5 g/l) i demineraliseret vand eller i den mineralske del af det syntetiske spildevand. Se tillæg 5 i kapitel C.10-A om uopløselige kemikalier. Denne metode er ikke velegnet til flygtige kemikalier uden at være modificeret til de rørformede reaktorer (afsnit 16). Bestem DOC og samlet organisk kulstof (TOC) i stamopløsningen, og gentag målingerne for hver ny batch. Hvis forskellen mellem DOC og TOC er større end 20 %, skal testkemikaliets vandopløselighed kontrolleres. Sammenlign DOC eller koncentrationen af testkemikaliet målt ved hjælp af specifik analyse af stamopløsningen med den nominelle

▼M4

værdi for at fastslå, hvorvidt genfindingen er god nok (normalt kan > 90 % forventes). Især for dispersioner skal det fastslås, hvorvidt DOC kan benyttes som analytisk parameter, eller om der kun kan anvendes en analyseteknik, der er specifik for det pågældende testkemikalie. Centrifugering af prøverne er obligatorisk i forbindelse med dispersioner. For hver ny batch skal DOC, COD eller testkemikaliet måles med specifikke analyser.

27. Bestem pH-værdien i stamopløsningen. Ekstreme værdier viser, at tilsætningen af kemikaliet kan påvirke pH-værdien af det aktiverede slam i testsystemet. I det tilfælde neutraliseres stamopløsningen med små mængder af uorganisk syre eller base for at opnå en pH-værdi på 7 ± 0,5. Undgå dog udfældning af testkemikaliet.

FREMGANGSMÅDE

*Tilberedning af organisk materiale til dosering*

28. Sørg for, at beholdere til indløb og udløb samt rørsystem fra indløbstanke og til udløbstanke er omhyggeligt rengjorte for at fjerne mikrobiel vækst fra starten og i løbet af testen.

29. Det syntetiske spildevand (afsnit 23) skal fremstilles frisk hver dag, enten af faststofferne eller af den koncentrerede stamopløsning i en passende fortynding med ledningsvand. Afmål den korrekte mængde i en cylinder, og hæld det i en ren indløbstank. Tilsæt om nødvendigt den nødvendige mængde stamopløsning af testkemikaliet eller referencekemikaliet til det syntetiske spildevand før fortynding. Hvis det er mere praktisk eller nødvendigt for at undgå spild af testkemikaliet, kan der fremstilles en separat fortyndet opløsning af testkemikaliet i en separat beholder, som tilføres de skråtstillede rør ved hjælp af en anden doseringspumpe.

30. Alternativt (og fortrinsvis) kan der benyttes sedimenteret husholdningsspildevand (afsnit 24), der opsamles frisk hver dag, hvis det er muligt.

*Brug af roterende rørreaktorer*

31. Der kræves to identiske rørreaktorer til vurdering af ét testkemikalie, og de opstilles i et rum med konstant rumtemperatur, normalt 22 ± 2 °C.

32. Juster slangepumperne til at pumpe 250 ± 25 ml/h af det organiske materiale (uden testkemikalie) over i de skråtstillede rør, der roteres ved 18 ± 2 rpm. Smøremidlet (afsnit 25) smøres på pumperørene inden brug og med jævne mellemrum i løbet af testen for at sikre korrekt funktion og for at forlænge rørenes levetid.

33. Juster rørenes hældningsvinkel til vandret for at give mulighed for en residenstid på 125 ± 12,5 sek. for det tilførte materiale i et rent rør. Anslå retentionstiden ved at tilsætte en ikke-biologisk markør (f.eks. NaCl, inaktivt farvestof). Den tid, det tager at nå spidskoncentrationen i udløbet, antages at være den gennemsnitlige retentionstid (når der er mest muligt film til stede, kan retentionstiden nå op på ca. 30 minutter).

34. Formålet med disse værdier, hastigheder og tider er at nå frem til tilstrækkelig eliminering (> 80 %) af DOC (eller COD) og for at kunne opnå nitrificerede udløb. Gennemstrømningshastigheden ændres, hvis eliminering ikke er tilstrækkelig, eller hvis der ydelsen på et bestemt rensningsanlæg skal simuleres. I sidstnævnte tilfælde justeres tilsætningen af det organiske materiale, indtil ydelsen i reaktoren passer til ydelsen i rensningsanlægget.

▼M4

*Inokulation*

35. Luftbåren inokulation kan være tilstrækkelig til at starte væksten af mikroorganismer, når der benyttes syntetisk spildevand, men ellers tilsættes 1 ml/l sedimenteret spildevand til tilløbet i tre dage.

*Målinger*

36. Med regelmæssige mellemrum kontrolleres det, at dosering og rotationshastighed ligger inden for de angivne grænser. Ligeledes måles pH-værdien i udløbet, især hvis der forventes nitrifikation.

*Prøvetagning og analyse*

37. Metode, mønster og frekvens for prøvetagning vælges i overensstemmelse med testens formål. Tag f.eks. stikprøver af indløb og udløb, eller indsaml prøver over en længere periode f.eks. 3-6 timer. I den første periode — uden testkemikalie — tages prøverne to gange om ugen. Filtrer prøverne gennem membraner eller i centrifuge ved ca. 40 000 $m/s^2$ i ca. 15 minutter (afsnit 18). Det kan være nødvendigt at lade prøverne bundfældes og/eller at grovfiltrere prøverne inden membranfiltrering. Foretag som minimum dobbeltbestemmelse af DOC (eller COD) samt BOD, ammoniak og nitrit/nitrat, hvis det er påkrævet.

38. Alle analyser udføres hurtigst muligt efter indsamling og tilberedning af prøverne. Hvis analyserne forsinkes, opbevares prøverne mørkt ved ca. 4 °C i flasker med tætsluttende låg. Hvis prøverne skal opbevares i mere end 48 timer, skal de konserveres ved hjælp af dybfrysning, syring eller ved tilsætning af et velegnet toksisk kemikalie (f.eks. 20 ml/l af en 10 g/l opløsning af kviksølv (II) chlorid). Det sikres, at konserveringsteknikken ikke påvirker analyseresultaterne.

*Indkøringsperiode*

39. I denne periode vokser overfladen på biofilmen, så den opnår en optimal tykkelse. Dette varer normalt ca. to uger og bør ikke vare længere end seks uger. Elimineringen (afsnit 44) af DOC (eller COD) tiltager og når en plateauværdi. Når plateauet er nået med samme værdi i begge rør, udvælges et af dem til at være kontrol for resten af testen, hvor deres ydelse skal forblive konsistent.

*Tilsætning af testkemikalie*

40. På dette tidspunkt tilsættes testkemikaliet til den anden reaktor i den korrekte koncentration, normalt 10-20 mg C/l. Kontrollen tilføres fortsat kun organisk materiale.

*Akklimatiseringsperiode*

41. Foretag fortsat analyser for DOC (eller COD) to gange om ugen. Hvis den primære biologiske nedbrydningsevne skal vurderes, måles koncentrationen af testkemikaliet også ved hjælp af en specifik analyse. Lad der gå fra en til seks uger (eller længere under særlige forhold), efter at testkemikaliet første gang blev tilsat, for at opnå akklimatisering. Når den procentvise eliminering (afsnit 43-45) når op på maksimumsværdi, registreres 12-15 gyldige værdier i plateaufasen over ca. 3 uger med henblik på at evaluere den gennemsnitlige procentvise eliminering. Testen betragtes for afsluttet, hvis der er opnået en tilstrækkelig høj grad af eliminering. Testen bør normalt ikke vare mere end 12 uger efter den første tilsætning af testkemikaliet.

▼M4

*Skred på filmen*

42. Der sker med relativt regelmæssige mellemrum en pludselig eliminering af større mængder af overskydende film fra rørene, også kaldet skred. For at sammenligneligheden mellem resultaterne ikke påvirkes, gennemføres testene over mindst to fulde cyklusser med vækst og skred.

DATA OG RAPPORTERING

**Behandling af resultater**

43. Beregn procentdelen af DOC- eller COD-eliminering af testkemikaliet for hver tidsbaseret vurdering ved hjælp af ligningen:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

hvor:

$D_t$ = procentvis eliminering af DOC eller COD på tidspunktet t

Cs = koncentration af DOC eller COD i indløb, der skyldes testkemikaliet, fortrinsvis anslået ud fra koncentrationen og den tilførte mængde i stamopløsningen (mg/l)

E = målt DOC eller COD i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

Eo = målt DOC eller COD i kontroludløb på tidspunktet t (mg/l).

Gentag beregningen for referencekemikaliet, hvis det testes.

**Kontrolreaktorens ydelse**

44. Graden af DOC- eller COD-eliminering ($D_B$) af det organiske materiale i kontrolreaktoren er nyttig viden i forbindelse med vurderingen af den biologiske nedbrydning af biofilmen i løbet af testen. Beregn den procentvise eliminering ved hjælp af ligningen:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

hvor:

Cm = DOC eller COD af det organiske materiale i kontrolindløb (mg/l).

45. Beregn elimineringen ($D_{ST}$) af testkemikaliet (hvis den måles) målt ved hjælp af en specifik analysemetode på hvert vurderingstidspunkt ved hjælp af ligningen:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

hvor:

Si = målt eller fortrinsvis estimeret koncentration af testkemikalie i testindløb (mg/l)

Se = målt koncentration af testkemikalie i testudløb på tidspunktet t (mg/l)

▼M4

Hvis analysemetoden giver en positiv værdi i uændret spildevand svarende til $S_c$ mg/l, beregnes den procentvise eliminering ($D_{SC}$) ved hjælp af ligningen:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\ \%$$

**Angivelse af testresultater**

46. Indtegn den procentvise eliminering $D_t$ og $D_{ST}$ (eller $D_{SC}$) i forhold til tiden (se tillæg 2 til kapitel C.10- A). Aflæs gennemsnitsafvigelsen (afrundet til nærmeste heltal) og standardafvigelsen af 12-15 værdier for $D_T$ (og evt. for $D_{ST}$) fra plateaufasen som den procentvise eliminering af testkemikaliet. Ud fra formen på elimineringskurven kan der drages en række konklusioner om elimineringsprocesserne.

**Adsorption**

47. Hvis der konstateres en høj DOC-eliminering af testkemikaliet fra begyndelsen af testen, elimineres testkemikaliet sandsynligvis ved adsorption til biofilmen. Dette kan bevises ved at bestemme det adsorberede testkemikalie i faststoffer, der er skredet af filmen. Sædvanligvis forbliver elimineringen af DOC af adsorberbare kemikalier ikke høj i løbet af hele testen. Normalt sker der en høj grad af eliminering i starten, hvorefter den falder til en ligevægtsværdi. Hvis det adsorberbare testkemikalie kan forårsage akklimatisering af den mikrobielle population, vil DOC-elimineringen af testkemikaliet efterfølgende stige og nå op på en høj plateauværdi.

**Lag-fase**

48. Som ved statiske screeningstest kræver mange testkemikalier en lag-fase, inden der sker fuld bionedbrydning. I lag-fasen sker der en akklimatisering eller tilpasning af de kompetente bakterier næsten uden eliminering af testkemikaliet, og derefter begynder disse bakteriers indledningsvise vækst. Denne fase afsluttes, og nedbrydningsfasen antages vilkårligt at begynde, når ca. 10 % af den oprindelige mængde testkemikalie er elimineret (efter mulighed for eventuel adsorption). Lag-fasen er ofte stærkt varierende og vanskelig at reproducere.

**Plateaufase**

49. En elimineringskurves plateaufase i en kontinuerlig test defineres som den fase, hvor den maksimale nedbrydning finder sted. Denne fase bør vare mindst tre uger og have ca. 12-15 målte gyldige værdier.

**Middelelimineringsgrad for testkemikaliet**

50. Beregn middelværdien ud fra elimineringsværdierne $D_t$ (og evt. $D_{st}$) for testkemikaliet i plateaufasen. Afrundet til nærmeste heltal (1 %) angiver det graden af eliminering af testkemikaliet. Det anbefales endvidere at beregne 95 %-konfidensintervallet af middelværdien. På tilsvarende måde beregnes middelværdien ($D_B$) for eliminering af det organiske materiale i kontrolbeholderen.

▼M4

**Indikation for bionedbrydning**

51. Hvis testkemikaliet ikke tydeligt adsorberer til biofilmen, og elimineringskurven har en typisk form for en bionedbrydningskurve med lag-, nedbrydnings- og plateaufaser (afsnit 48 og 49), kan den målte eliminering med sikkerhed tilskrives bionedbrydning. Hvis der er sket en høj eliminering i starten, kan simuleringstesten ikke differentiere mellem biologiske og abiotiske elimineringsprocesser. I sådanne tilfælde, og hvis der i øvrigt er tvivl om den biologiske nedbrydning (f.eks. hvis der optræder stripning), skal de adsorberede testkemikalier analyseres i filmprøver, eller yderligere statiske test af bionedbrydning gennemføres baseret på parametre, der klart indicerer biologiske processer. Sådanne test omfatter metoder til oxygenoptagelse (kapitel C.4 i dette bilag D, E og F) (9) eller en test, der måler $CO_2$-produktion (kapitel C.4-C i dette bilag eller Headspace-metoden) (10). Som inokulum anvendes præeksponeret biofilm fra den relevante reaktor.

52. Hvis både DOC-elimineringen og den specifikke eliminering af kemikaliet er målt, indicerer signifikante forskelle (hvis førstnævnte er lavere end sidstnævnte) mellem de eliminerede procentdele, at der i udløbet forekommer mellemliggende organiske produkter, som kan være sværere at nedbryde end det oprindelige kemikalie.

**Testresultaternes validitet**

53. Testen anses for at være gyldig, hvis graden af DOC- eller COD-eliminering ($D_B$) i kontrolenhederne er > 80 % efter to uger, og der ikke er gjort unormale observationer.

54. Hvis der er testet et let biologisk nedbrydeligt (reference) kemikalie, bør graden af biologisk nedbrydelighed være > 90 %, og forskellen mellem dobbeltværdier bør ikke overstige 5 %. Hvis disse to kriterier ikke opfyldes, gennemgås forsøgsprocedurerne, og/eller husholdningsspildevand indhentes fra en anden kilde.

55. Tilsvarende bør forskellene mellem værdier for biologisk nedbrydelighed fra eventuelle dobbeltenheder, der behandler et testkemikalie, ikke afvige mere end 5 %. Hvis dette kriterium ikke opfyldes, men eliminering er høj, fortsættes analysen i yderligere tre uger. Hvis elimineringen er lav, undersøges de hæmmende effekter på testkemikaliet, hvis de ikke er kendte. Testen gentages med en lavere koncentration af testkemikalie, hvis det er muligt.

**Testrapport**

56. Testrapporten skal indeholde følgende:

*Testkemikalie:*

— identifikationsdata

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber.

*Testbetingelser:*

— enhver modifikation af testsystemet, især hvis der testes uopløselige eller flygtige stoffer

— typen af organisk materiale

— art og andel af industriaffald i spildevandet (hvis anvendt og kendt)

— inokulationsmetode

▼M4

— stamopløsning af testkemikalie — indhold af DOC (opløst organisk kulstof) og TOC (samlet organisk kulstof); hvordan blev den fremstillet (hvis suspension); anvendte testkoncentration(er), hvis uden for intervallet 10-20 mg/l DOC, angives årsager; tilsætningsmetode; dato for første tilsætning; enhver ændring i koncentrationen

— gennemsnitlig hydraulisk retentionstid (uden vækst), rørets rotationshastighed, omtrentlig vinkel på hældning, hvis muligt

— oplysninger om skred (tid og intensitet)

— testtemperatur og -interval

— anvendte analyseteknikker.

*Testresultater:*

— alle målte, relevante data (DOC, COD, specifikke analyser, pH-værdi, temperatur og N-kemikalier)

— alle beregnede værdier af $D_t$ (eller $D_{tc}$), $D_B$ og $D_s$ opstillet i tabelform og elimineringskurver

— oplysninger om lag- og plateaufaser, testvarighed, elimineringsgraden af testkemikaliet, referencekemikaliet (hvis testet) og det organiske materiale i kontrolenheden, statistiske oplysninger og udtryk for biologisk nedbrydelighed og testens validitet

— diskussion af resultater.

*LITTERATUR:*

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed A-F.

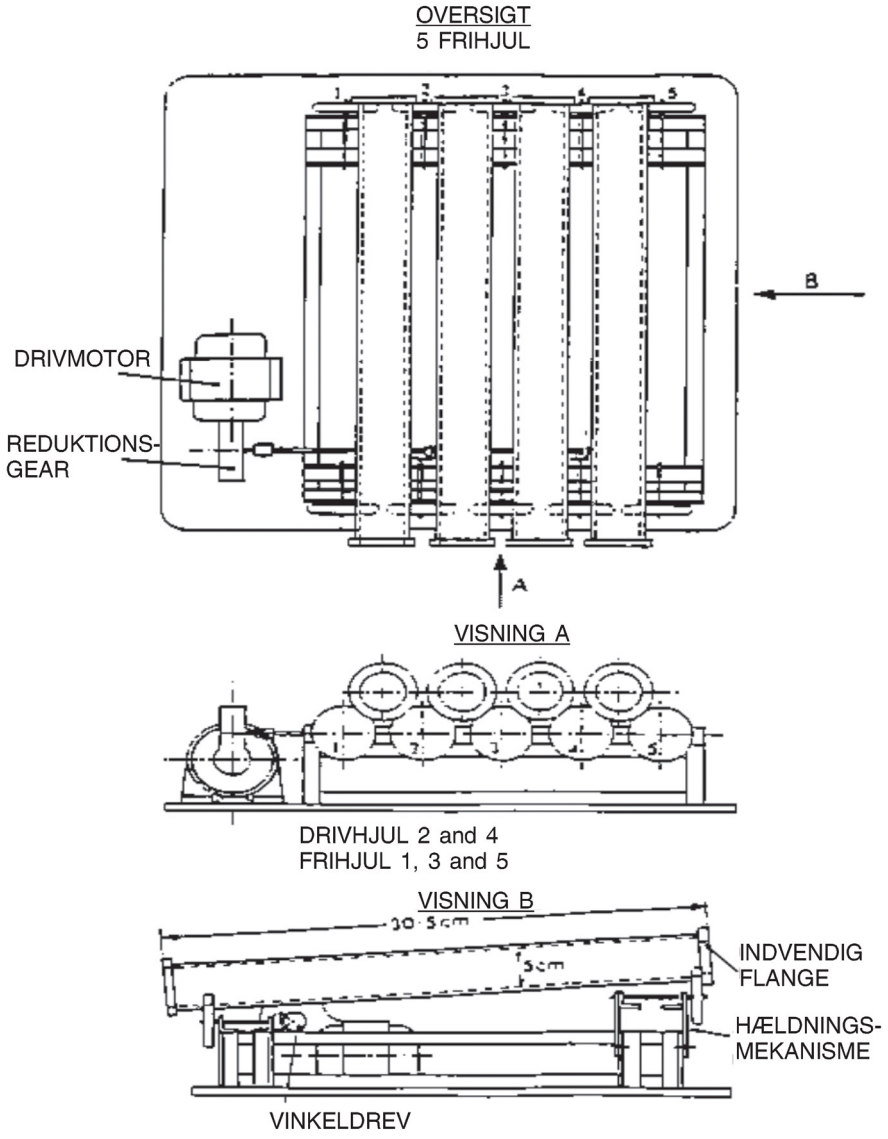
(10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼M4

*Tillæg 8*

*Figur 1*

**Roterende rør**




*Ordliste:*

Oversigt

Visning A/B

Drivhjul

Frihjul

Drivmotor

Reduktionsgear

Indvendig flange

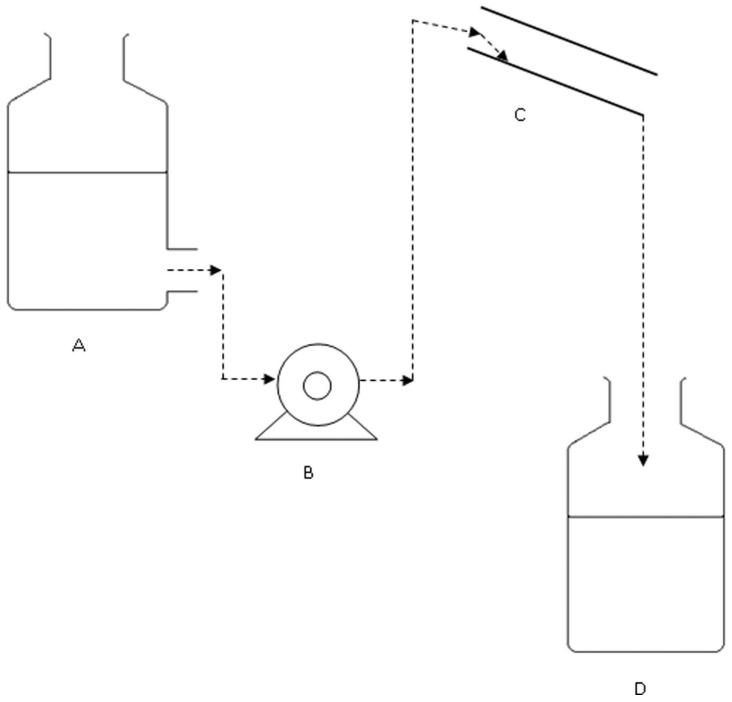
Hældningsmekanisme

Vinkeldrev

▼**M4**

*Figur 2*

**Strømningsdiagram**




A: Tilsætningstank

B: Slangepumpe

C: Roterende rør

D: Opsamlingsbeholder til udløb

*DEFINITIONER*

Testkemikalie: ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Kemikalier: »Det bør bemærkes, at termen »kemikalie« er brugt i bred forstand i UNCED-aftalerne og de efterfølgende dokumenter og omfatter stoffer, produkter, blandinger, præparater eller alle andre termer, der anvendes i eksisterende systemer til at angive dækning«.

▼B

## C.11. BIOLOGISK NEDBRYDNING

### AKTIVERET SLAM — RESPIRATIONSHÆMNINGSTEST

### 1. METODE

#### 1.1. INDLEDNING

Den beskrevne metode vurderer virkningen af et teststof på mikroorganismer ved måling af respirationshastigheden under definerede betingelser ved forskellige koncentrationer af teststoffet.

Formålet med metoden er at give en hurtig screening-metode til identifikation af stoffer, der kan påvirke et aerobt mikrobielt rensningsanlæg uheldigt, og at indikere passende ikke-hæmmende koncentrationer af teststoffer til anvendelse i bionedbrydelighedstest.

Inden den endelige test kan der udføres en forprøve. Den giver oplysninger om det koncentrationsinterval, som skal anvendes i hovedtesten.

I testen indgår to kontroltest, én i begyndelsen og én i slutningen af testrækken, Desuden bør hvert parti aktiveret slam også kontrolleres ved brug af et referencestof.

Metoden kan lettest benyttes for stoffer, der på grund af deres opløselighed i vand og ringe flygrighed sandsynligvis vil forblive i vandet.

Det kan for stoffer med begrænset opløselighed i testmediet vise sig umuligt at bestemme $EC_{50}$.

Resultater, der er baseret på oxygenoptagelse, kan føre til fejlslutninger, hvis teststoffet har tendens til at afkoble oxidativ phosphorylering.

Det er nyttigt at have følgende oplysninger, når testen skal foretages:

— vandopløselighed

— damptryk

— strukturformel

— teststoffets renhed.

*Anbefaling*

Aktiveret slam kan indeholde potentielt patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

#### 1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Respirationshastigheden er oxygenforbruget hos mikroorganismer i aerobt spildevandsslam og udtrykkes almindeligvis i mg $O_2$ pr. mg slam pr. time.

▼B

Til beregning af et teststofs hæmmende virkning i en bestemt koncentration udtrykkes respirationshastigheden som en procentdel af gennemsnittet af to kontrolrespirationshasrigheder:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{ \% hæmning}$$

hvor:

$R_s$ = oxygenforbruget ved testkoncetrationen af teststoffet

$RC_1$ = oxygenforbruget, kontrol 1

$RC_2$ = oxygenforbruget, kontrol 2.

I forbindelse med denne metode er $EC_{50}$ den koncentration af teststoffet, hvorved respirationen er 50 % af den, som kontroltesten viser under de i denne metode beskrevne betingelser.

1.3. REFERENCESTOFFER

Det anbefales at bruge 3,5-dichlorphenol, som vides at hæmme respiration, som referencestof og at teste det for $EC_{50}$ for hvert parti aktiveret slam for at kontrollere, at slammets følsomhed ikke er unormal.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Respirationshastigheden i aktiveret slam tilført en standardmængde syntetisk spildevand måles efter en kontakttid på 30 minutter og/eller tre timer. Respirationshastigheden i det samme aktiverede slam ved forskellige koncentrationer af teststoffet under i øvrigt identiske betingelser måles også. Teststoffets hæmmende virkning ved en bestemt koncentration udtrykkes som en procentdel af middelrespirationshastigheden i to kontroltest. Der beregnes en $EC_{50}$-værdi ud fra bestemmelser ved forskellige koncentrationer.

1.5. KVALITETSKRITERIER

Testresultaterne er gyldige, hvis:

— respirationshastigheden i de to kontroltest ligger inden for 15 % af hinanden

— $EC_{50}$ (30 minutter og/eller tre timer) for 3,.5-dichlorphenol ligger inden for det accepterede område på 5 til 30 mg/l.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. *Reagenser*

1.6.1.1. Opløsninger af teststoffet

Teststofopløsningerne frisklaves ved undersøgelsens indledning ved brug af en stamopløsning. En stamopløsningskoncentration på 0,5 g/l er egnet, hvis nedenstående anbefalede fremgangsmåde følges.

▼B

1.6.1.2. Opløsning af kontrol stoffet

Der fremstilles som eksempel en 3,5-dichlorphenolopløsning ved at opløse 0,5 g 3,5-dichlorphenol i 10 ml 1 M NaOH og fortynde med destilleret vand til ca. 30 ml; derefter tilsættes under omrøring 0,5 M $H_2SO_4$ til det punkt, hvor udfældning begynder — der kræves ca. 8 ml 0,5 M $H_2SO_4$ — og endelig fortyndes blandingen med destilleret vand til 1 l. pH skulle derefter være omkring 7 til 8.

1.6.1.3. Syntetisk spildevand

Der kan tillaves syntetisk spildevand ved opløsning af følgende mængder stof i 1 l vand:

— 16 g pepton

— 11 g kødekstrakt

— 3 g urea

— 0,7 g NaCl

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$

— 0,2 g $MgSO_4.7H_20$

— 2,8 g $K_2HPO_4$.

*Note 1*: Dette syntetiske spildevand er 100 gange så koncentreret som det, der er beskrevet i OECD Technical Report »Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents« af 11. juni 1976 med tilsætning af dikaliumhydrogenphosphat.

*Note 2:* Hvis det fremstillede medium ikke anvendes straks, skal det opbevares i mørke ved 0 til 4 °C, dog ikke længere end en uge og under forhold som ikke giver anledning til ændring i sammensætningen. Medium kan også steriliseres forud for oplagringen, eller der kan tilsættes pepton og kødekstrakt, kort tid før testen udføres. Umiddelbart før brug blandes omhyggeligt og pH justeres.

1.6.2. *Apparatur*

Måleapparatur: Det er ikke afgørende, hvordan apparaturet nærmere er udformet. Der må imidlertid ikke være luftmellemrum mellem væske og prop, og sonden skal slutte tæt til kolbens hals.

Der kræves normalt laboratorieudstyr og især følgende:

— måleapparatur

— beluftningsapparatur

— pH-elektrode og -måleudstyr

— $O_2$-elektrode.

1.6.3. *Forberedelse af inoculum*

Som mikrobielt inoculum til testen anvendes aktiveret slam fra et rensningsanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand.

På laboratoriet kan grovere praktikler om nødvendigt fjernes ved kort henstand, f.eks. 15 minutter, efterfulgt af dekantering af det øverste lag med finere slampartikler. Alternativt kan slammet anvendes efter blanding i få sekunder i blender.

▼B

Hertil kommer, at slammet bør vaskes med vand (fra hanen) eller en isotonisk opløsning, hvis hæmmende stoffer kan forudses at være til stede. Efter centrifugering dekanteres supernatanten fra, hvilket gentages tre gange.

En mindre mængde af slammet afvejes og tørres. Herudfra kan beregnes den mængde af vådt slam, som skal suspenderes i vand for at opnå et aktivt slam med et indhold af faste bestanddele suspenderet i en blandet væske på 2 til 4 g/l. Dette svarer til en koncentration på 0,8 til 1,6 g/l i testmediet, hvis den nedenfor anbefalede procedure følges.

Hvis slammet ikke kan anvendes den dag, det er indsamlet, tilsættes der 50 ml syntetisk spildevand til hver liter aktiveret slam, der er fremstillet som ovenfor beskrevet; slammet beluftes derefter natten over ved 20 ± 2 °C. Det holdes derefter beluftet, indtil det anvendes den følgende dag. Inden anvendelsen kontrolleres pH, som om nødvendigt bufferes til pH 6 til 8. De faste bestanddele, der er suspenderet i den blandede væske, bestemmes som beskrevet i foregående afsnit.

Hvis der er behov for at anvende det samme parti slam de efterfølgende dage (højst fire dage), tilsættes yderligere 50 ml syntetisk spildevand ved hver arbejdsdags slutning.

1.6.4. *Fremgangsmåde*

| | |
|---|---|
| Varighed/kontakttid: | 30 minutter og/eller tre timer under beluftning |
| Vand: | Drikkevand (om nødvendigt befriet for chlor) |
| Lufttilførsel: | Ren, oliefri luft. Luftgennemstrømning 0,5 til 1,0 l/min. |
| Måleapparatur: | Fladbundet kolbe som f.eks. en BOD-kolbe (se figur 1) |
| Oxygenmåler: | Oxygenelektrode med tilhørende skriver |
| Næringsopløsning: | Syntetisk spildevand (se ovenfor) |
| Teststof: | Testopløsningen laves frisk ved testens begyndelse |
| Referencestof: | F.eks. 3,5-dichlorphenol (mindst tre koncentrationer) |
| Kontroltest: | Inokuleret prøve uden teststof |
| Temperatur: | 20 ± 2 °C. |

Nedenfor gives forslag til en eksperimentel procedure, der kan følges for både testen og referencestoffet i tre-timers kontaktperioden:

Der anvendes flere beholdere (f.eks. et-liters bægerglas).

Der benyttes mindst fem koncentrationer med et fast koncentrationsforhold på helst ikke over 3,2.

På tidspunktet »0« fortyndes 16 ml af det syntetiske spildevand med vand til 300 ml. Der tilsættes 200 ml af det mikrobielle inoculum, og hele blandingen (500 ml) hældes i en første beholder (første kontrol $C_1$).

▼B

Testbeholderen skal gennemluftes kontinuerligt for at sikre, at opløst ilt ($O_2$) ikke falder under 2,5 mg/l, og at iltkoncentrationen er i størrelsesorden 6,5 mg/l umiddelbart før målingen af respirationshastigheden.

På tidspunkt »15 minutter« (15 minutter er et vilkårligt, men bekvemt interval) gentages ovenstående proces, bortset fra at der tilsættes 100 ml teststofstamopløsning til de 16 ml syntetisk spildevand, før der tilsættes vand ti! 300 ml og mikrobielt inoculum til i alt 500 ml. Denne blanding hældes dernæst et andet bægerglas og beluftes som omhandler ovenfor. Denne proces gentages med 15 minutters intervaller med forskellige mængder teststofstamopløsning, således at der bliver en række beholdere med forskellige koncentrationer af teststoffet. Til slut fremstilles en anden kontrol ($C_2$).

Efter tre timers forløb måles pH, og efter god blanding hældes en del af den første beholders indhold over i måleapparaturet, og respirationshastigheden måles over en periode pi indtil ti minutter.

Denne bestemmelse gentages for hver beholders indhold med 15 minutters intervaller, således at kontakttiden for hver beholder bliver tre timer.

Referencestoffet testes med hver parti mikrobielt inoculum på samme måde.

Et andet system (f.eks. mere end en oxygenmåler) vil være nødvendigt, når der skal foretages målinger efter 30 minutters kontakt.

Hvis der kræves måling af det kemiske oxygenforbrug, må der fremstilles andre beholdere, som indeholder teststof, syntetisk spildevand og vand, men ikke aktiveret slam. Oxygenforbruget måles og registreres efter en beluftningstid på 30 minutter og/eller tre timer (kontakttid).

2. **DATA OG VURDERING**

Respirationshastigheden beregnes ud fra skriverkurven som mg $O_2$/l × h mellem ca. 6,5 mg $O_2$/l og 2,5 mg $O_2$/l, eller over en ti minutters periode, hvis respirationshastigheden er lav. Den del af respirationskurven, som respirationshastigheden måles over, skal være lineær.

Hvis respirationshastighedeme i de to kontroltest ikke ligger inden for 15 % af hinanden, eller hvis referencestoffets $EC_{50}$ (30 minutter og/eller tre timer) ikke ligger inden for det accepterede område (5 til 30 mg/l for 3,5-dichlorphenol), er testen ugyldig og må gentages.

Hæmningsprocenten beregnes ved hver testkoncentration (se 1.2). Hæmningsprocenten aftegnes mod koncentration på semilogaritmisk papir (eller probit), og der udledes en $EC_{50}$-værdi.

95 %-konfidensgrænserne for $EC_{50}$-værdierne kan bestemmes ved hjælp af standardprocedurer.

▼B

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— teststof: data for kemisk identifikation

— testsystem: kilde, koncentration og eventuel forbehandling af det aktiverede slam

— testbetingelser:

  — reaktionsblandingens pH før respirationsmåling

  — testtemperatur

  — testens varighed

  — referencestof og dets målte $EC_{50}$

  — eventuel abiotisk oxygenoptagelse

— resultater:

  — alle målte data

  — hæmningskurve og metode til beregning af $EC_{50}$

  — $EC_{50}$, og om muligt 95 % konfidensgrænser, $EC_{50}$ og $EC_{20}$

  — alle observationer og eventuelle afgivelser fra denne testmetode, som kan have haft indflydelse på resultatet.

3.2. FORTOLKNING AF DATA

$EC_{50}$ værdien må kun betragtes som vejledende for teststoffets sandsynlige toksicitet for enten spildevandsbehandling med aktiveret slam eller mikroorganismer i spildevand, da de komplekse vekselvirkninger, der forekommet i miljøet, ikke kan simuleres nøjagtigt i en laboratorietest. Hertil kommer, at teststoffer, som har en hæmmende effekt på ammoniakoxidation, også kan give anledning til atypiske hæmningskurver. Sådanne kurver må fortolkes med forsigtighed.

4. **HENVISNINGER**

(1) International Standard ISO/8192 — 1986.

(2) Broecker, B. and Zahn, R., Water Research 11, 1997, s. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R. and Schaefer, L., Chemosphere 10, s. 245 (1981).

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No. 3 03, også beskrevet af:

(5) B. Robra, Wasser/Abwasser 117, s. 80 (1976).

(6) W. Schefer, Textilveredlung 6, s. 247 (1977).

(7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209. Decision of the Council C(81) 30 Final.

▼B

C.12. **BIOLOGISK NEDBRYDNING**

MODIFICERET SCAS-TEST

1. **METODE**

1.1. INDLEDNING

Formålet med denne metode er at bedømme den potentielle fuldstændige bionedbrydelighed af vandopløselige, ikke-flygtige organiske stoffer, når disse udsættes for ret høje koncentrationer af mikroorganismer over et længere tidsrum. I dette tidsrum holdes mikroorganismerne i live ved en daglig tilførsel af næring bestående af bundfældet spildevand. (I forbindelse med weekenden kan spildevandet opbevares ved 4 ºC, eller det syntetiske spildevand til OECD's confirmatory test kan anvendes).

Der kan finde fysisk-kemisk adsorption sted på de suspenderede faste stoffer, og der skal tages hensyn hertil ved fortolkningen af resultaterne (jf. 3.2).

På grund af den flydende fases lange opholdstid (36 timer), og da der med mellemrum tilføres næringsstoffer, simulerer testen ikke de normale vilkår i et spildevandsanlæg. De resultater, der er opnået med forskellige teststoffer, viser, at denne metode har en høj bionedbrydningsevne.

Delbetingelser, der skabes i denne metode, letter i høj grad selektion og/eller adaptation af mikroorganismer, der er i stand til at nedbryde teststoffet. (Denne fremgangsmåde kan ligeledes anvendes til at at fremstille akklimatiserede inocula til brug i andre test).

I denne test vurderes teststoffernes fuldstændige bionedbrydelighed ved måling af koncentrationen af opløst organisk kulstof (DOC). Det bør foretrækkes at bestemme koncentrationen af opløst organisk kulstof efter oprensning af den sure opløsning snarere end som forskellen mellem total C og uorganisk C.

Ved samtidig brug af en specifik analysemetode kan teststoffets primære nedbrydning (nedbrydning af en oprindelige kemiske struktur) vurderes.

Denne metode kan kan anvendes på organiske teststoffer, som ved den i analysen anvendte koncentration:

— er opløselige i vand (mindst 20 mg opløst organisk kulstof/l)

— har et ubetydeligt damptryk

— ikke er hæmmende over for bakterier

— ikke adsorberes væsentligt i testsystemet

— ikke går tabt ved, at testopløsningen skummer.

Teststoffets indhold af organisk kulstof skal være bekendt.

▼B

Oplysninger om de relative mængder af teststoffets hovedkomponenter vil være nyttige for fortolkningen af de opnåede resultater, specielt i de tilfælde, hvor resultaterne er lave eller marginale.

Oplysninger om stoffets toksicitet for mikroorganismer kan være nyttige for fortolkningen for lidet signifikante resultater og for valg af en egnet testkoncentration.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

$C_T$ = koncentration af organisk kulstof i teststoffet, til stede i eller tilsat det bundfældende spildevand ved begyndelsen af beluftningsperioden (mg/l)

$C_t$ = koncentrationen af opløst organisk kulstof i supernatanten ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l)

$C_c$ = koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrollens supernatant ved afslutningen af beluftningsperioden (mg/l).

Bionedbrydeligheden defineres i denne test som det organiske kulstofs orsvinden. Bionedbrydningen kan udtrykkes som:

1. Den procentvise forsvinden $D_{da}$ af den mængde af stoffet, der tilføres dagligt:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

hvor:

$D_{da}$ = nedbrydning/daglig tilførsel.

2. Den procentvise forsvinden $D_{ssd}$ af den mængde stof, der er til stede ved hver dags begyndelse:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

hvor:

$D_{ssd}$ = nedbrydning/stof ved dagens begyndelse.

Indekserne i og (i+ 1) henviser til testdagen.

Ligning [2(a)] bør anvendes, hvis spildevandets indhold af opløst organisk kulstof svinger fra dag til dag, medens ligning [2(b)] kan anvendes, når mængden af opløst organisk kulstof er forholdsvis konstant fra dag til dag.

▼B

1.3. REFERENCESTOFFER

I visse tilfælde kan referencestoffer være nyttige ved undersøgelsen af et nyt stof. Der kan imidlertid ikke anbefales noget bestemt referencestof.

Der angives oplysninger om flere forskellige stoffer, der er evalueret i ringtest (jf. tillæg 1), først og fremmest for at testmetoden af og til kan kalibreres, men også for at resultaterne kan sammenlignes, hvis der anvendes en anden metode.

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Aktiveret slam fra et biologisk rensningsanlæg placeres i en semikontinuerlig aktiveret slamenhed (semi-continous activated sludge — SCAS). Teststoffet og bundfældet husholdningsspildevand tilføres, og blandingen beluftes i 23 timer. Beluftningen indstilles derefter, slammet gives tid til at bundfælde sig, og supernatantvæsken fjernes.

Det tilbageblevne slam i beluftningskammeret iblandes dernæst en yderligere mængde af teststoffet og spildevandet, hvorefter cyklussen begynder forfra.

Bionedbrydning konstateres ved at bestemme indholdet af opløst organisk kulstof i supernatantvæsken. Dette resultat sammenlignes med resultatet af analysen af væsken fra en kontrolenhed, som kun er tilført bundfældet spildevand.

Såfremt der anvendes en specifik analysmetode, kan ændringer i koncentrationen af det oprindelige stof som følge af bionedbrydningen måles (primær bionedbrydelighed).

1.5. KVALITETSKRITERIER

Denne metodes reporducerbarhed, baseret på fjernelse af opløst organisk kulstof, er endnu ikke fastslået. (For så vidt angår primær bionedbrydning, er der opnået meget nøjagtige data for let nedbrydelige stoffer).

Metodens følsomhed afhænger i vid udstrækning af variabiliteten i blindprøven og i mindre grad af den nøjagtighed, hvormed indholdet af opløst organisk kulstof kan bestemmes, eller af væskens indhold af teststof ved påbegyndelsen af hver enkelt cyklus.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTPROCEDUREN

1.6.1. *Forberedelse*

Et tilstrækkeligt antal rene beluftningsenheder (i stedet kan den oprindelige 1,5 l SCAS-prøveenhed anvendes) og lufttilførselsslanger (figur 1) for hvert enkelt teststof og til kontrollen klargøres. Den komprimerede luft, der tilføres testenhederne, renses med er vatfilter og bør være fri for organisk kulstof og være forudmættet med vand, så fordampningstab reduceres.

Fra et aktiveret slamanlæg, der primært behandler husholdningsspildevand, tages en prøve af blandet væske, indeholdende 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter. Til hver beluftningsenhed kræves ca. 150 ml af den blandede væske.

▼B

Stamopløsninger af teststoffet tilberedes i destilleret vand. Den normalt krævede koncentration er 400 mg organisk kulstof pr. liter hvilket giver en koncentration af teststoffet på 20 mg/l ved påbegyndelsen af hver beluftningscyklus, såfremt der ikke finder bionedbrydning sted.

Der; kan anvendes højere koncentrationer, hvis toksiciteten over for mikroorganismerne tillader det.

Slamopløsningernes indhold af organisk kulstof måles.

1.6.2. *Testbetingelser*

Testen bar foretages ved 20 til 25 ºC.

Der anvendes en høj koncentration af aerobe mikroorganismer (fra 1 til 4 g suspenderet fast stof pr. liter), og den effektive opholdstid er 36 timer. Det kulstofholdige materiale i det tilførte spildevand iltes grundigt, sædvanligvis inden otte timer efter påbegyndelsen af hver beluftningscyklus. Derefter respirerer slammet endogent i resten af beluftningsperioden, hvorunder det eneste tilgængelige substrat er teststoffet, medmindre også dette metaboliseres hurtigt. Disse forhold, kombineret med daglig genpodning af prøven, når husholdningsspildevand anvendes som medium, giver uhyre gunstige betingelser for såvel akklimatisering som høj grad af bionedbrydning.

1.6.3. *Gennemførelsen af testen*

Der fremstilles en prøve af blandet væske fra en laboratorieenhed, der overvejende behandler husholdningsspildevand eller fra et egnet aktiveret slamanlæg, og prøven opbevares under aerobe betingelser indtil anvendelsen i laboratoriet. Hver beluftningsenhed samt kontrolenheden påfyldes 150 ml (hvis den oprindelige SCAS-test anvendes, multipliceres de anførte volumener med 10) blandet væske, og beluftningen påbegyndes. Efter 23 timers forløb indstilles beluftningen, og slammet bundfældes i 45 minutter. Hanen på hver kolbe åbnes successivt, og der udtages 100 ml af supernatantvæsken. Der klargøres en prøve bundfældet husholdningsspildevand umiddelbart før brug, og 100 ml heraf tilsættes det tilbageblevne slam i hver beluftningsenhed. Beluftningen påbegyndes på ny. På dette stadium tilsættes intet teststof. Enhederne tilsættes dagligt husholdningsspildevand, men kun indtil det tidspunkt, hvor bundfældningen resulterer i en klar supernatant væske. Dette tager sædvanligvis op til to uger, hvorefter det opløste organiske kulstof i supernatantvæsken ved afslutningen af hver beluftningscyklus nærmer sig en konstant værdi.

Ved afslutningen af dette tidsrum blandes de forskellige bundfældede slamprøver, og 50 ml af denne blandede slamprøve tilsættes til hver enhed.

Der tilsættes 95 ml bundfældet spildevand og 5 ml vand til kontrolenhederne, og 95 ml bundfældet spildevand plus 5 ml af den pågældende stamopløsning af teststoffet (400 mg/l) til testenhederne. Beluftningen påbegyndes atter og fortsættes i 23 timer. Slammet bundfældes i 45 minutter, og supernatantvæsken fjernes og analyseres for opløst organisk kulstof.

Ovenstående påfyldnings- og aftapningsprocedure gentages dagligt under hele testens forløb.

▼B

Inden bundfældningen kan det være nødvendigt at rense enhedernes vægge for at forhindre akkumulering af faste stoffer over væskens niveau. For at undgå krydskontaminering anvendes der en separat skraber eller børste for hver enkelt enhed.

Ideelt set bør indholdet af opløst organisk kulstof i supernatantvæskerne bestemmes dagligt, selv om mindre hyppige analyser kan tillades. Inden analysen filtreres væskerne gennem vaskede membranfiltre med en porestørrelse på 0,45 μm, eller væskerne centrifugeres. Membranfiltre er egnede, hvis der er sikkerhed for, at de hverken afgiver kulstof eller adsorberer stoffet under filtreringen. Prøvens temperatur må ikke overstige 40 °C, så længe den er i centrifugen.

Testens varighed er ubestemt for stoffer, der udviser ringe eller ingen bionedbrydning. Erfaringerne viser dog, at den generelt bør vare mindst 12 uger, men ikke længere end 26 uger.

## 2. DATA OG EVALUERING

Værdierne for indholdet af opløst kulstof i supernatant væskerne i testenhederne og i kontrolenhederne afbildes mod tiden i et koordinatsystem.

Efterhånden som nedbrydningen skrider frem, vil niveauet i testenheden nærme sig niveauet i kontrolenheden. Når forskellen mellem de ro niveauer er konstant i tre på hinanden følgende målinger, gennemføres der et tilstrækkeligt antal yderligere målinger til en statistisk behandling af dataene, og den procentvise bionedbrydning af teststoffet beregnes ($D_{da}$ eller $D_{ssd}$, jf. 1.2).

## 3. RAPPORTERING

### 3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal om muligt indeholde følgende:

— fuldstændige oplysninger om spildevandets art, om hvilken type enhed der er anvendt samt om forsøgsresultaterne vedrørende teststoffet, referencestoffet, hvis et sådan er anvendt, og blindprøven

— temperatur

— kurve for det organiske kulstofs forsvinden, med beskrivelse af beregningsmetode (jf. 1.2)

— dato og sted for prøveudtagning af aktiveret slam og spildevand, status vedrørende adaptation, koncentration osv.

— videnskabelige grunde til eventuelle ændringer i testproceduren

— underskrift og dato.

▼B

3.2. FORTOLKNING AF RESULTATERNE

Eftersom det stof, der kan testes med denne metode, ikke vil være let bionedbrydeligt, vil enhver forsvinden af opløst organisk kulstof, som udelukkende skyldes bionedbrydning, normalt forløbe gradvis over dage eller uger, undtagen i sådanne tilfælde, hvor akklimatiseringen er pludselig, hvilket fremgår af en abrupt forsvinden efter nogle uger.

Fysisk-kemisk adsorption kan imidlertid nogle gange spille en betydelig rolle. Dette er tilfældet, når der ved begyndelsen indtræder en fuldstændig eller delvis forsvinden af det tilsatte opløste organiske kulstof. Hvad der derefter sker, afhænger af forskellige faktorer, såsom adsorptionsgraden og koncentrationen af suspenderet fast stof i det bortkastede spildevand. Forskellen mellem koncentrationen af opløst organisk kulstof i kontrol- og testenhedernes supernatantvæsker øges sædvanligvis gradvis fra den først indtrufne værdi, og denne forskel forbliver dernæst på den nye værdi under resten af forsøget, medmindre der finder akklimatisering sted.

Når der skal skelnes mellem bionedbrydning (eller delvis bionedbrydning) og adsorption, er yderligere analyser påkrævet. Dette kan gøres på flere forskellige måder, men den mest pålidelige metode er at anvende supernatantvæsken, eller slam, som podestof i en basissættest (helst en respirometrisk test).

Teststoffet, der resulterer i omfattende, ikke adsorptiv forsvinden af opløst organisk kulstof, bør i denne test betragtes som potentielt bionedbrydeligt. Delvis ikke-adsorptiv forsvinden tyder på, at stoffet i hvert fald er bionedbrydeligt til en vis grad.

Ringe eller ingen forsvinden af opløst organisk kulstof kan skyldes teststoffets hæmning af mikroorganismerne. Dette kan ligeledes afsløres af lysis og tab af slam, hvilket giver uklare supernatantvæsker. Testen bør i så fald gentages med anvendelse af en lavere koncentration af teststoffet.

Anvendelsen af en specifik analysemetode eller C-14-mærket teststof kan give større følsomhed. Anvendes der et C-14-teststof, vil genfinding af $^{14}CO_2$ bekræfte, at der har fundet bionedbrydning sted.

Såfremt der ligeledes angives resultater for primær bionedbrydning, bør der om muligt gives en forklaring på den forandring i den kemiske struktur, der medfører, at det oprindelige teststof ikke kan påvises.

Valideringen af analysemetoden skal anføres sammen med værdierne for blindprøvemediet.

4. **HENVISNINGER**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A. Decision of the Council C(81) 30 Final.

▼B

*Tillæg 1*

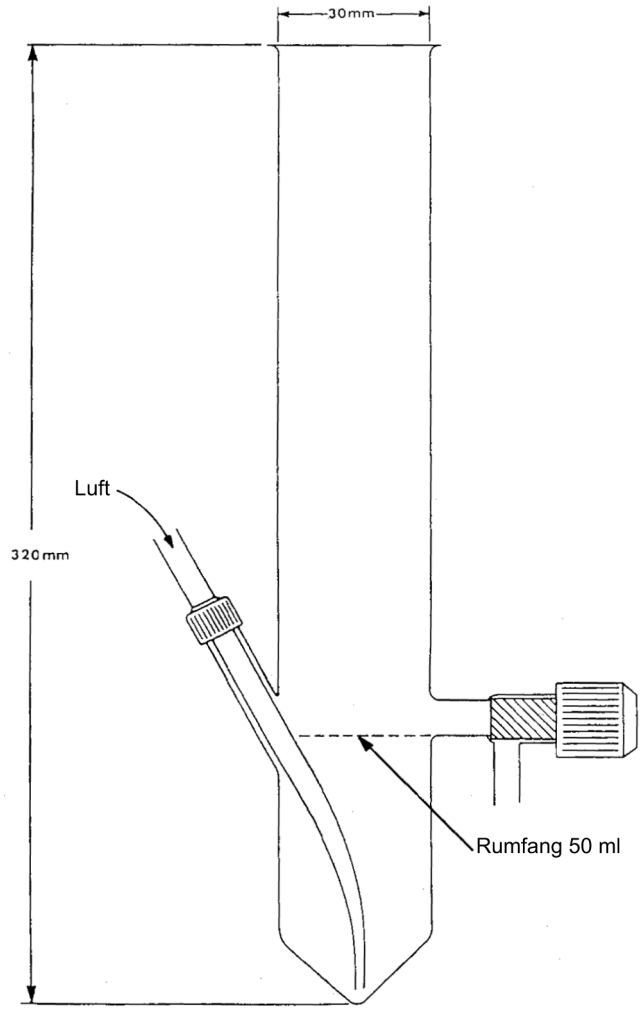
**SCAS-test: eksempel på resultater**

| Stof | $C_T$ (mg/l) | $C_t$–$C_c$ (mg/l) | Procent bioned-brydning $D_{da}$ | Testens varighed (dage) |
|---|---|---|---|---|
| 4-acetylaminobenzensulfonat | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| Tetrapropylonbenzensulfonat | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-nitrophenol | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| Diethylen glycol | 16,5 | 0,2 | 98,8 | 40 |
| Anilin | 16,9 | 1,7 | 95,9 | 40 |
| Cyclopentantetracarboxylat | 17,9 | 3,2 | 81,1 | 120 |

▼B

*Tillæg 2*

**Eksempel på apparatur**



▼B

C.13. **BIOKONCENTRERING: GENNEMSTRØMNINGSTEST MED FISK**

1. **METODE**

Denne biokoncentreringsmetode er en gengivelse af OECD Test Guideline 305 (1996).

1.1. INDLEDNING

I denne metode beskrives en fremgangsmåde for karakterisering af stoffers biokoncentreringspotentiale i fisk under gennemstrømning. Test ved gennemstrømning er langt at foretrække, men også semistatiske systemer tillades, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Testen er så detaljeret beskrevet, at den kan udføres, samtidig med at der er tilstrækkelig frihed til at tilpasse tilrettelægningen af forsøgene til særlige forhold i laboratorierne og teststoffernes særlige egenskaber. Metoden er bedst til stabile organiske kemiske stoffer med en log $P_{ow}$-værdi mellem 1,5 og 6,0 (1), men den kan også anvendes for ekstremt lipofile stoffer (med log $P_{ow}$ > 6,0). Den på forhånd skønnede biokoncentreringsfaktor (BCF), undertiden benævnt $K_B$, for sådanne ekstremt lipofile stoffer vil normalt være højere end den værdi af ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren ($BCF_{SS}$), man må forvente at finde ved laboratorieforsøg. Forhåndsskøn over biokoncentreringsfaktoren for organiske stoffer med log $P_{ow}$-værdier op til ca. 9,0 kan beregnes efter udtrykket i Bintein et al (2). De parametre, der karakteriserer biokoncentreringspotentialet, er hastighedskonstanten for optagelse ($k_1$), hastighedskonstanten for udskillelse ($k_2$) og $BCF_{SS}$.

Radioaktivt mærkede teststoffer kan gøre analyse af vand- og fiskeprøver lettere og kan benyttes til at afgøre, om der skal foretages identifikation og kvantitativ bestemmelse af nedbrydningsprodukter. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (f.eks. ved forbrænding eller opløsning af væv), vil BCF blive baseret på den oprindelige forbindelse, eventuelle tilbageholdte metabolitter og assimileret kulstof. BCF-værdier, der baseres på det samlede indhold af radioaktivt materiale, kan derfor ikke altid sammenlignes direkte med en BCF-værdi, der er bestemt ved specifik kemisk analyse for den oprindelige forbindelse alene.

Ved undersøgelser med radioaktivt mærkede stoffer kan der benyttes oprensningsprocedurer til bestemmelse af BCF baseret på den oprindelige forbindelse, og de vigtigste metabolitter kan om nødvendigt karakteriseres. Man kan også kombinere en undersøgelse af metabolisme i fisk med en biokoncentreringsundersøgelse ved at analysere og identificere stofrester i væv.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

Ved *biokoncentrering/bioakkumulering* forstås en koncentrationsforøgelse af teststoffet i eller på en organisme (eller specificerede væv deraf) i forhold til koncentrationen af teststoffet i det omgivende medium.

Ved *biokoncentreringsfaktoren* (BCF eller $K_B$) på et givet tidspunkt under optagelsesfasen af akkumuleringstesten forstås koncentrationen af teststoffet i/på fiskene eller specificerede væv deraf ($C_f$ i µg/g (ppm)) divideret med koncentrationen af det kemiske stof i det omgivende medium ($C_w$ i µg/ml (ppm)).

▼B

*Ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren* ($BCF_{SS}$ eller $K_B$) ændrer sig ikke væsentligt over et længere tidsrum, idet koncentrationen af teststoffet i det angivende medium er konstant i dette tidsrum.

Man taler om et *plateau* eller en *ligevægtstilstand* i afbildningen af teststoffet i fisk ($C_f$) mod tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af $C_f$ i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de tre prøveudtagningsperioder. Ved pooling af prøver til analyse, kræves der mindst fire på hinanden følgende analyser. For teststoffer, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende.

En *biokoncentreringsfaktor,* der er beregnet direkte ud fra kinetiske hastighedskonstanter ($k_1/k_2$), betegnes den kinetiske koncentreringsfaktor, $BCF_k$.

*Ved octanol-vand fordelingskoefficienten* ($P_{ow}$) forstås forholdet mellem et kemisk stofs opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt (metode A.8), også betegnet $K_{ow}$. Logaritmen til $P_{ow}$ benyttes som rettesnor for et kemisk stofs potentiale for biokoncentrering i vandorganismer.

Ved *eksponeringsfasen* eller *optagelsesfasen* forstås det tidsrum, hvori fiskene udsættes for teststoffet.

Ved *hastighedskonstant for optagelse* ($k_1$) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsforøgelsen af teststoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf), når fiskene udsættes for stoffet ($k_1$ udtrykkes i $dag^{-1}$).

Ved *udskillelsesfasen* forstås det tidsrum efter overførsel af forsøgsfiskene fra et medium med teststoffet i til et medium uden stoffet, hvor man undersøger udskillelsen (eller nettoafgivelsen) af stoffet fra forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf).

Ved *hastighedskonstant for udskillelse* ($k_2$) forstås den talværdi, der angiver hastigheden for koncentrationsfaldet af teststoffet i forsøgsfiskene (eller specificerede væv deraf), efter at de er overført fra et medium med teststoffet i til et medium uden dette stof ($k_2$ udtrykkes i $dag^{-1}$).

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Testen falder i to faser, en eksponeringsfase (optagelsesfase) og en udskillelsesfase. I optagelsesfasen udsættes separate grupper af fisk af én art for mindst to koncentrationer af teststoffet. De overføres dernæst til et medium uden teststoffet, hvor udskillelsesfasen forløber. Der kræves altid en udskillelsesfase, undtagen hvis optagelsen af stoffet under eksponeringsfasen har været ubetydelig (f.eks.hvis BCF er mindre end 10). Under begge testens faser følges koncentrationen af stoffet i eller på fiskene (eller specificerede væv deraf). Der holdes samtidig en kontrolgruppe af fisk under samme betingelser, bortset fra at der ikke er noget teststof til stede, så man kan sammenholde eventuelle skadevirkninger i biokoncentreringstesten med en tilsvarende kontrolgruppe og bestemme baggrundskoncentrationer af teststof.

▼B

Optagelsesfasen varer i 28 dage, medmindre det godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Ud fra ligningerne i bilag 3 kan man forudsige, hvor lang tid optagelsesfasen vil vare, og hvor lang tid der vil gå, inden der er ligevægt. Udskillelsesperioden indledes dernæst ved, at fiskene overføres til en ren beholder med samme medium, men uden teststof. Når det er muligt, beregnes biokoncentreringsfaktoren både som forholdet ($BCF_{SS}$) mellem koncentrationen i fiskene ($C_f$) og i vandet ($C_W$) ved ligevægt, og som kinetisk biokoncentreringsfaktor ($BCF_K$) som forholdet mellem hastighedskonstanterne for optagelse ($k_1$) og udskillelse ($k_2$), idet kinetikken antages at være af første orden. Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, må der benyttes mere komplekse modeller (bilag 5).

Hvis der ikke nås ligevægt inden 28 dage, forlænges optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage: Derefter påbegyndes udskillelsesfasen.

Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for udskillelse (eller konstanterne, hvis der er tale om mere komplekse modeller), biokoncentreringsfaktoren og så vidt muligt konfidensgrænser for hver af disse parametre beregnes ud fra den model, der bedst beskriver de målte koncentrationer af teststof i fisk og vand.

BCF udtrykkes som en funktion af fiskenes samlede vægt. I særlige tilfælde kan dog bestemte væv eller organer (f.eks. muskelvæv eller lever) anvendes, hvis fiskene er tilstrækkelig store, eller fiskene kan opdeles i en spiselig fraktion (filet) og en ikke-spiselig fraktion (indvolde). Da der for mange organiske stoffer er en tydelig sammenhæng mellem biokoncentreringspotentialet og stoffets lipofile karakter, er der en tilsvarende sammenhæng mellem forsøgsfiskenes fedtindhold og stoffernes observerede biokoncentrering. For at imødegå sådanne udsving i forsøgsresultater for stærkt lipofile stoffer (dvs. log $P_{ow} > 3$) bør biokoncentreringen udtrykkes både i forhold til fedtindholdet og i forhold til den samlede legemsvægt.

Fedtindholdet skal om muligt bestemmes på det samme biologiske materiale, som benyttes til bestemmelse af teststoffets koncentration.

1.4. OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Inden biokoncentreringstesten udføres, skal følgende oplysninger om teststoffet foreligge:

— opløselighed i vand

— octanol-vand fordelingskoefficient $P_{ow}$ (betegnes også $K_{ow}$, bestemt ved en HPLC-metode i A.8)

— hydrolyse

— fotokemisk omdannelse i vand bestemt ved bestråling med sollys og simuleret sollys under samme bestrålingsforhold som ved testen for biokoncentrering (3)

▼B

— overfladespænding (dvs. for stoffer, hvis $P_{ow}$ ikke kan bestemmes)

— damptryk

— umiddelbar bionedbrydelighed (når det er relevant)

Blandt andre nødvendige oplysninger er toksiciteten over for den fiskeart, der benyttes til testen, helst den asymptotiske (dvs. tidsuafhængige) $LC_{50}$. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og følsomhed til kvantitativ bestemmelse af teststoffet i opløsninger og biologisk materiale og oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares. Hvis der bruges $^{14}C$-mærkede teststoffer, skal den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt.

1.5. TESTENS GYLDIGHED

Følgende betingelser skal være til stede, for at testen betragtes som gyldig:

— temperaturudsving må ikke være større end ± 2 °C

— koncentrationen af opløst oxygen må ikke komme under 60 % af mætning

— koncentrationen af teststoffet i kamrene skal ligge inden for ± 20 % af gennemsnittet af de målte værdier under eksponeringsfasen

— dødeligheden og andre skadevirkninger/sygdomme må ved testens afslutning højst være 10 % både i kontrolgruppen og i de eksponerede fisk: Hvis testen strækker sig over flere uger eller måneder, må dødsfald og andre skadevirkninger i begge grupper højst være 5 % om måneden og højst 30 % i alt.

1.6. REFERENCESTOFFER

Det kan være nyttigt at anvende referencestoffer med kendt biokoncentreringspotentiale til kontrol af forsøgsmetoden, hvis dette er påkrævet. Der kan dog endnu ikke anbefales nogen bestemte stoffer.

1.7. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.7.1. *Apparatur*

Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, der kan opløses eller adsorbere, absorbere eller afgive stoffer og have en skadelig virkning på fiskene. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardkar af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af fisk. Bløde plastslanger bør benyttes mindst muligt. Der skal helst bruges rør og slanger af teflon (R), rustfrit stål eller glas. Erfaringerne har vist, at det til stoffer med høj adsorptionskoefficient såsom syntetiske pyrethroider kan være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde må udstyret kasseres efter brug.

▼B

1.7.2. *Vand*

Til testen benyttes sædvanligvis råvand, som skal være af ensartet kvalitet og komme fra en ikke-forurenet kilde. Vand til fortynding skal være af en sådan kvalitet, at den valgte fiskeart kan overleve akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Allerhelst bør det godtgøres, at fiskearten kan overleve, vokse og formere sig i fortyndingsvandet (f.eks. i laboratoriekultur eller en toksicitetstest over en hel livscyklus). Vandet skal beskrives i hvert fald ved sit pH, hårdhed, tørstof i alt og organisk kulstof i alt, og gerne også indholdet af ammonium, nitrit og nitrat, samt for saltvandsfisk saltholdigheden. Selv om det er velkendt, hvilke parametre der er vigtige for fisks velfærd, er der i bilag 1 anført anbefalede maksimumkoncentrationer for en række parametre for fersk- og saltvand til forsøg.

Vandet skal være af konstant kvalitet under hele forsøget. Dets pH skal være mellem 6 og 8,5, men for en given test skal det ligge konstant inden for ± 0,5. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke ubehørigt påvirker forsøgsresultatet (f.eks. ved kompleksdannelse med teststoffet) eller indvirker negativt på fiskebestanden, udtages der regelmæssigt prøver til analyse. Indholdet af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), vigtige anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og $SO_4$) pesticider (f.eks. organiske phosphorforbindelser i alt og organiske chlorforbindelser i alt), organisk kulstof i alt og opslæmmet tørstof bør bestemmes f.eks. hver tredje måned, når fortyndingsvandet vides at være af forholdsvis konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten kan påvises at have været konstant i mindst et år, kan hyppigheden sættes ned (til f.eks. hvert halve år).

Både det naturlige partikelindhold og indholdet af organisk kulstof i alt (TOC) i fortyndingsvandet skal være så lavt som muligt, så man undgår absorption af teststoffet ti! organisk materiale, hvilket kan nedsætte dets biotilgængelighed (4). Den højeste acceptable værdi er 5 mg/l for partikler (tørstof, der ikke passerer et 0,45 μm filter) og 2 mg/l for organisk kulstof i alt (se bilag 1). Om nødvendigt må vandet filtreres inden brugen. Bidraget til indholdet af organisk kulstof i vandet fra testfiskene (ekskrementer) og føderester skal holdes så lavt som muligt. Under hele testen må koncentrationen af organisk kulstof i testkarret ikke overstige koncentrationen af organisk kulstof hidrørende fra teststoffet og et eventuelt opløsende stof med mere end 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Testopløsninger*

Der fremstilles en stamopløsning af teststoffet med en passende koncentration. Den skal helst fremstilles ved simpel blanding eller omrystning af teststoffet med vand. Brug af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløsende stoffer) anbefales ikke, men det kan i visse tilfælde være nødvendigt for at opnå en passende koncentreret stamopløsning. Som opløsningsmiddel kan der benyttes ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Der bør udvises forsigtighed med brug af let bionedbrydelige midler, da de kan skabe problemer med bakterievækst i test med gennemstrømning. Teststoffet kan være radioaktivt mærket og skal være af størst mulig renhed (f.eks. helst > 98 %).

▼B

Til forsøg med gennemstrømning kræves der er system, der kontinuerligt leverer og fortynder en stamopløsning af teststoffet (f.eks. doseringspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), til tilførsel af teststoffet ti! kamrene. Der tilstræbes en udskiftning på mindst fem gange dagligt pr. testkammer. Gennemstrømningsmetoden bør foretrækkes, men kan det ikke lade sig gøre (f.eks. hvis testorganismerne tager skade), kan der bruges en semistatisk teknik, forudsat at gyldighedskriterierne er opfyldt. Flowhastighederne for stamopløsning og fortyndingsvand kontrolleres 48 timer før testens begyndelse og derefter mindst dagligt under testen. Ved denne kontrol måles flowet i hvert testkammer, og det sikres, at det ikke varierer med mere end 20 %, hverken inden for hvert kammer eller mellem kamrene.

1.7.4. *Valg af fiskeart*

Blandt de vigtige kriterier ved valg af fiskearten er, at den skal være let at få fat i, kunne fås i passende størrelser og let kunne holdes i laboratoriet. Andre kriterier for valg af fiskeart kan være dens rekreative, kommercielle eller økologiske betydning, dens følsomhed i forhold til andre arter og gode erfaringer med den.

I bilag 2 er anført nogle fiskearter, som anbefales til test. Der kan anvendes andre arter, men testmetoden må i så fald tilpasses, så testbetingelserne bliver passende. Der skal da anføres en begrundelse for valg af art og testmetode.

1.7.5. *Opbevaring af fisk*

Stampopulationen af fisk akklimatiseres i mindst to uger i vand ved testtemperaturen og gives hele tiden tilstrækkeligt af det foder, som skal benyttes under testen.

Efter en 48-timers tilpasningsperiode noteres dødeligheden, og der anvendes følgende kriterier:

— dødelighed over 10 % efer syv dage: Hele partiet forkastes

— dødelighed mellem 5 % og 10 % efter syv dage: Akklimatiseringen fortsættes i endnu syv dage

— dødelighed under 5 % efter syv dage: Partiet accepteres; hvis dødeligheden er over 5 % efter endnu syv dage, forkastes hele partiet.

Det sikres, at ingen af fiskene til testen har synlige sygdomme eller misdannelser. Syge fisk kasseres. Fisk må ikke behandles mod sygdomme hverken under testen eller i to uger forud for testen.

▼B

1.8. TESTENS UDFØRELSE

1.8.1. *Indledende test*

Det kan være nyttigt at gennemføre et indledende eksperiment med henblik på at optimere testbetingelserne for den endelige test, f.eks. valg af koncentration(er) af teststoffet og længden af eksponerings- og udskillelsesfasen.

1.8.2. *Eksponeringsbetingelser*

1.8.2.1. Optagelsesfasens længde

Forudsigelse af optagelsesfasens længde kan ske på grundlag af praktiske erfaringer (f.eks. fra en tidligere undersøgelse eller et andet kemisk stof, der akkumuleringsmæssigt ligner) eller ved hjælp af forskellige empiriske sammenhænge ud fra kendskab til stoffets opløselighed i vand eller dets octanol/vand fordelingskoefficient (se bilag 3).

Optagelsesfasen bør vare 28 dage, medmindre det kan godtgøres, at der inden da er indtrådt ligevægt. Er der ikke opnået ligevægt efter 28 dage, forlænges optagelsesfasen, og målingerne fortsættes, indtil der er nået ligevægt, dog højst 60 dage.

1.8.2.2. Udskillelsesfasens længde

Normalt er en periode på halvdelen af optagelsesfasen tilstrækkeligt til at opnå et passende fald (f.eks. 95 %) i fiskenes belastning med stoffet (se redegørelsen for skønnet i bilag 3). Hvis der skal bruges urealistisk lang tid til at opnå et fald på 95 %, f.eks. dobbelt så lang tid som en normal optagelsesfase (dvs. mere end 56 dage), kan tidsrummet sættes ned (dvs. indtil koncentrationen af teststoffet er mindre end 10 % af ligevægtskoncentrationen). For stoffer med mere komplekse optagelses- og udskillelsesmønstre end det, hvor fisken betragtes som en helhed, og hvor der gælder førsteordenskinetik, må der dog benyttes en længere udskillelsesfase til bestemmelse af hastighedskonstanterne. Periodens længde kan f.eks. bestemmes af, hvor længe koncentrationen af teststoffet i fiskene er højere end påvisningsgrænsen.

1.8.2.3. Antal testfisk

Der udvælges så mange fisk pr. testkoncentration, at der mindst er fire fisk til rådighed pr. prøve ved hver prøveudtagning. Ønskes der større statistisk styrke, må antallet af fisk pr. prøve øges.

Hvis der benyttes voksne fisk, anføres i rapporten, om der er brugt hanner, hunner eller begge køn i eksperimentet. Hvis begge køn er anvendt, skal det dokumenteres, at der inden eksponeringen ikke er nogen signifikant forskel i fedtindhold mellem kønnene; pooling af alle hanner og hunner kan være påkrævet.

▼B

Til en given test udvælges der fisk af samme vægt, således at den mindste ikke vejer mindre end to tredjedele af den største. Alle fisk skal være af samme årgang og komme fra samme kilde. Da fiskenes alder og vægt undertiden synes at indvirke signifikant på BCF-værdierne (1), skal disse oplysninger noteres nøjagtigt. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten ved at veje en delprøve af fiskebestanden.

1.8.2.4. Belastning

Der benyttes et højt forhold mellem vand og fisk, så faldet i $C_w$ som følge af overførsel af fiskene ved testens begyndelse bliver så lille som muligt, og for at undgå, at koncentrationen af opløst oxygen falder. Det er vigtigt, at belastningen afpasses efter den anvendte fiskeart. I alle tilfælde anbefales normalt en belastning på 0,1-1,0 g fisk (våd vægt) pr. liter vand pr. dag. Belastningen kan sættes op, hvis det godtgøres, at den nødvendige koncentration af teststof kan fastholdes inden for ± 20 %, og at koncentrationen af opløst oxygen ikke kommer under 60 % af mætning.

Der skal tages hensyn til fiskeartens normale levevilkår ved valget af belastning. Eksempelvis kan bundfisk kræve større bundareal i akvariet for samme vandrumfang end pelagiske fiskearter.

1.8.2.5. Fodring

Under akklimatisering og test gives fiskene passende foder med kendt fedt- og proteinindhold i en sådan mængde, at de forbliver sunde og bevarer deres legemsvægt. Fiskene fodres dagligt under akklimatisering og test med en mængde svarende til ca. 1-2 % af legemsvægten; på denne måde holdes fedtkoncentrationen i de fleste fiskearter nogenlunde konstant under testen. Fodermængden beregnes på ny f.eks. en gang om ugen, så legemsvægt og fedtindhold holdes konstant. Til denne beregning kan man skønne vægten af fiskene i de enkelte kamre ud fra vægten af de fisk, der senest er taget op fra det pågældende kammer. De fisk, der bliver tilbage i kamrene, må ikke vejes.

Hver dag kort efter fodringen (30 min-l time) suges overskydende foder og ekskrementer op fra testkamrene. Kamrene holdes så rene som muligt under testen, så koncentrationen af organisk kulstof er så lav som mulig, eftersom tilstedeværende organisk kulstof kan nedsætte teststoffets biotilgængelighed (1).

Da meget foder er fremstillet af fiskemel, må det analyseres for teststoffet. Foderet bør tillige analyseres for pesticider og tungmetaller.

▼B

1.8.2.6. Lys og temperatur

Lysperioden er normalt 12-16 timer, og temperaturen (± 2 °C) skal være afpasset efter testfiskearten (se bilag 2). Belysningens type og karakteristika skal være kendt. Man bør være opmærksom på en eventuel fotokemisk omdannelse af teststoffet ved belysningsforholdene under undersøgelsen. Der skal benyttes en passende belysning, hvor det undgås, at fiskene udsættes for kunstigt fremkaldte fotokemiske omdannelsesprodukter. Det kan i nogle tilfælde være hensigtsmæssigt at afblænde UV-stråling under 290 nm med et filter.

1.8.2.7. Testkoncentrationer

Fiskene udsættes under gennemstrømning for mindst to koncentrationer af teststoffet i vand. Normalt sættes den højeste koncentration af teststoffet til ca. 1 % af den akutte asymptotiske $LC_{50}$ og mindst ti gange højere end påvisningsgrænsen i vand ved den anvendte analysemetode.

De højeste testkoncentration kan også fastsættes ved division af den akutte 96 h $LC_{50}$ med et passende akut/kronisk-forhold (for nogle kemiske stoffer vil et passende forhold ligge fra ca 3 op til 100). Om muligt vælges den eller de andre testkoncentrationer, således at den (de) er en faktor ti lavere. Kan det ikke lade sig gøre på grund af 1 % af $LC_{50}$ -kriteriet og analysegrænsen, kan der benyttes en mindre faktor, eller man kan overveje at benytte $^{14}C$-mærket teststof. Der må ikke benyttes koncentrationer højere end teststoffets opløselighed.

Hvis der benyttes et opløsende stof, må koncentrationen ikke være større end 0,1 ml/1, og den skal være den samme i alle testkar. Dette stofs og teststoffets bidrag til det samlede indhold af organisk kulstof i testvandet skal være kendt. Det skal dog så vidt muligt undgås at benytte sådanne materialer.

1.8.2.8. Kontrolgrupper

Der skal ud over testrækken være en kontrolgruppe med fortyndingsvand eller en kontrolgruppe med et eventuelt opløsende stof, forudsat at det er fastslået, at det opløsende stof ikke har nogen virkning på fisk. Er det ikke tilfældet, skal begge kontrolgrupper forefindes.

1.8.3. *Hyppighed af målinger af vandkvaliteten*

Under testen måles opløst oxygen, TOC, pH og temperatur i alle kar. I kontrolkarrene og karret med den højeste koncentration måles vandets samlede hårdhed og saltholdighed, hvis det er relevant. Som minimum måles opløst oxygen og eventuel saltholdighed tre gange — ved begyndelsen, midt i og ved slutningen af optagelsesperioden — og en gang ugentligt i udskillelsesperioden. TOC måles ved testens begyndelse (24 h og 48 h før optagelsesfasen begynder), før fiskene overføres, og mindst en gang ugentligt under både optagelses- og udskillelsesfasen. Temperaturen måles dagligt, pH ved begyndelsen og slutningen af hver periode, og hårdheden én gang ved hver test. Temperaturen skal helst følges kontinuerligt i mindst ét at karrene.

▼B

1.8.4. *Prøveudtagning og analyse af fisk og vand*

1.8.4.1. Plan for udtagning af prøver af fisk og vand

Der udtages prøver af vandet fra testkamrene med henblik på bestemmelse af teststofkoncentrationen, både inden fiskene overføres og under optagelses- og udskillelsesfasen. Som minimum udtages der prøver af vandet samtidig med prøver af fisk og før fodring. Under optagelsesfasen bestemmes teststofkoncentrationen til kontrol af, at gyldighedskriterierne er opfyldt.

Der udtages prøver af fisk mindst fem gange under optagelsesfasen og mindst fire gange under udskillelsesfasen. Da det i nogle tilfælde vil være vanskeligt at beregne et rimelig præcist skøn over BCF-værdien ud fra dette prøveantal, især hvis det formodes, at udskillelsen ikke følger en simpel førsteordenskinetik, kan det anbefales at øge prøveudtagningshyppigheden i begge perioder (se bilag 4). De ekstra prøver opbevares og analyseres kun, hvis resultaterne af den første analyserunde viser sig utilstrækkelig til beregning af BCF med den ønskede præcision.

I bilag 4 er der vist et eksempel på en acceptabel prøveudtagningsplan. Der kan let opstilles andre planer efter beregning af eksponeringstider for 95 % optagelse ud fra andre antagne $P_{ow}$-værdier.

Prøveudtagningen fortsættes under optagelsesfasen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 28 dage. Er der ikke nået ligevægt inden for 28 dage, fortsættes prøveudtagningen, indtil der er opnået ligevægt, dog højst 60 dage. Før udskillelsesfasen overføres fiskene til rene kar.

1.8.4.2. Udtagning og forberedelse af prøver

Vandprøver til analyse kan f.eks. udtages ved opsugning gennem et rør af inert materiale fra et sted midt i testkammeret. Da hverken filtrering eller centrifugering synes at kunne adskille den ikke-biotilgængelige fraktion af teststoffet fra den biotilgængelige (især for ekstremt lipofile stoffer, dvs. stoffer med log $P_{ow}$ > 5) (1) (5) i alle tilfælde, må prøverne ikke behandles på denne måde.

I stedet må man sørge for at holde karrene så rene som muligt, og indholdet af organisk kulstof i alt følges under såvel optagelses- som udskillelsesfasen.

Der udtages et passende antal fisk (normalt mindst fire) fra testkarrene ved hver prøveudtagning. De udtagne fisk skylles hurtigt med vand, duppes tørre og aflives med det samme på den mest velegnede og humane måde, hvorefter de vejes.

Fiske- og vandprøver skal helst analyseres umiddelbart efter udtagningen, så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og udskillelseshastigheder. Ved at foretage analyserne med det samme opdager man straks, når et plateau er nået.

▼B

Foretages analyserne ikke med det samme, opbevares prøverne hensigtsmæssigt. Inden undersøgelsen påbegyndes, indhentes der oplysninger om, hvordan det pågældende teststof bør opbevares, f.eks. dybfrysning, henstand ved 4 °C, opbevaringstid og ekstraktion.

1.8.4.3. Analysemetodens kvalitet

Da hele proceduren i vid udstrækning afhænger af analysemetodens nøjagtighed, præcision og følsomhed, kontrolleres det eksperimentelt, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af teststoffet i både vand og fisk for den valgte metode. Det kontrolleres tillige, at teststoffet ikke kan påvises i det anvendte fortyndingsvand.

Om nødvendigt korrigeres de under testen funde $C_w$- og $C_f$-værdier for genfinding og baggrundsværdier i kontrolgrupperne. Fiske- og vandprøver håndteres hele tiden på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. ved adsorption i prøveudtagningsudstyret) er mindst mulige.

1.8.4.4. Analyse af fiskeprøver

Hvis der i testen anvendes radioaktivt mærket materiale, kan man analysere for det samlede indhold af radioaktivitet (dvs. det oprindelige stof og dets metabolitter), eller prøverne kan oprenses, så den oprindelige forbindelse kan analyseres særskilt. Også de vigtigste metabolitter kan karakteriseres ved ligevægtstilstanden eller ved afslutningen af optagelsesfasen, hvis den nås først. Hvis BCF udtrykt som samlet mængde radioaktivt mærket materiale er ≥ 1 000 % tilrådes det — for visse stoffers, f.eks. pesticiders, vedkommende henstilles det kraftigt — at nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af restindholdet i alt i fiskevævet ved ligevægt, identificeres og bestemmes kvantitativt. Hvis nedbrydningsprodukter, der udgør ≥ 10 % af radioaktivt mærket restindhold i alt i fiskevævet, identificeres og bestemmes kvantitativt, anbefales det at gøre det samme for nedbrydningsprodukter i testvandet.

Normalt skal koncentrationen af teststoffet bestemmes i hver enkelt fisk efter vejning. Er det ikke muligt, kan prøverne fra hver prøveudtagning pooles, men pooling indskrænker mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis en bestemt statistisk metode og styrke er vigtige hensyn, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange fisk til, at den ønskede pooling og styrke tilgodeses (6) (7).

BCF udtrykkes både som funktion af samlet våd vægt og — for stærkt lipofile stoffer — som funktion af fedtindholdet. Fiskenes fedtindhold bestemmes om muligt ved hver prøveudtagning. Bestemmelsen af fedtindholdet skal bestemmes ved hjælp af egnede metoder (henvisning (8) og (2) i bilag 3). Som standardmetode kan ekstraktion med chloroform/methanol anbefales (9). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier (10), er det vigtigt at give nærmere oplysninger om, hvilken metode der er benyttet. Når det er muligt, skal lipidanalysen foretages på samme ekstrakt, som er benyttet til analyse for teststoffet, eftersom lipiderne ofte må fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi. Forskellen mellem fiskenes fedtindhold (i mg pr. kg våd vægt) ved begyndelsen af eksperimentet og ved slutningen må ikke være større end ± 25 %. Også vævets tørstofindhold skal oplyses, så lipidkoncentrationen kan omregnes fra våd basis til tørstofbasis.

▼B

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Teststoffets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på fiskene (eller bestemt væv) under optagelsesfasen mod tiden (lineære akser). Hvis kurven viser et plateau, dvs. at den er omtrent parallel med tidsaksen, beregnes ligevægtsværdien $BCF_{SS}$ ved hjælp af udtrykket

$$\frac{C_f \text{ ligevægt (gennemsnit)}}{C_w \text{ ligevægt (gennemsnit)}}$$

Hvis der ikke opnås ligevægt, kan der beregnes en $BCF_{SS}$-værdi, der er tilstrækkelig nøjagtig til risikovurderingsformål, ud fra en »stationær tilstand« ved 80 % ($1{,}6/k_2$) eller 95 % ($3{,}0/k_2$) af ligevægt.

Også biokoncentreringsfaktoren $BCF_k$ beregnes som forholdet $k_1/k_2$, de to førsteordens hastighedskonstanter. Hastighedskonstanten for udskillelse ($k_2$) bestemmes normalt ud fra udskillelseskurven (dvs. en afbildning af faldet i teststoffets koncentration i fiskene mod tiden). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse ($k_1$) på grundlag af $k_2$ og en værdi af $C_f$, som udledes af optagelseskurven (se også bilag 5). Til at finde $BCF_k$ og hastighedskonstanterne $k_1$ og $k_2$ foretrækkes ikke-lineære parameterestimeringsmetoder på computer (11). Ellers kan der benyttes grafiske metoder til beregning af $k_1$ og $k_2$. Hvis udskillelseskurven tydeligvis ikke er af første orden, må der tages mere komplekse modeller i brug (se henvisningerne i bilag 3) og søges biostatistisk bistand.

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Hvis der i prøveopløsninger måles koncentrationer nær analysemetodens påvisningsgrænse, skal resultaterne fortolkes med forsigtighed.

Skarpe optagelses- og udskillelseskurver er tegn på biokoncentreringsdata af høj kvalitet. Forskellen mellem optagelses- og udskillelseskonstanterne ved to testkoncentrationer bør være mindre end 20 %, Hvis der iagttages signifikante forskelle i optagelses- og udskillelseskonstanter mellem de to anvendte testkoncentrationer, skal dette noteres og forsøges forklaret. Normalt ligger konfidensgrænserne for BCF-værdier i vel tilrettelagte undersøgelser omkring ± 20 %.

3. **RAPPORTERING**

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

3.1. TESTSTOF

— dets fysiske tilstandsform og relevante fysiske og kemiske egenskaber

— data til kemisk identifikation (herunder et eventuelt indhold af organisk kulstof)

— hvis stoffet er radioaktivt mærket, de mærkede atomers nøjagtige position og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder.

▼B

3.2. TESTART

— dens videnskabelige navn, stamme, kilde, eventuel forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse mv.

3.3. TESTBETINGELSER

— testprocedure (f.eks. gennemstrømning eller semistatisk)

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testens tilrettelægning (f.eks. testkamrenes antal og størrelse, vandudskiftningsrate, antal gentagelser, antal fisk pr. gentagelse, antal testkoncentrationer, optagelses- og udskillelsesfasens længde samt udtagningshyppighed for fiske- og vandprøver)

— metode til fremstilling af stamopløsninger og fornyelseshyppighed (hvis der er benyttet et opløsende stof, oplyses dets koncentration og dets bidrag til testvandets indhold af organisk kulstof)

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testkarrene samt hvilken metode der er benyttet til bestemmelsen

— kilde til fortyndingsvand, beskrivelse af en eventuel forbehandling, resultater af forsøg til bekræftelse af, at fisk kan leve i vandet, samt vandets parametre: pH, hårdhed, temperatur, koncentration af opløst oxygen, restchlorindhold (hvis bestemt), organisk kulstof i alt, opslæmmet tørstof, testmediets saltholdighed (hvis relevant) samt alle andre foretagne målinger

— kvaliteten af vandet i testkarrene, pH, hårdhed, TOC, temperatur og koncentration af opløst oxygen

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. foderets type, kilde og sammensætning (i hvert fald fedtog proteinindhold) samt fodermængde og fodringshyppighed)

— oplysninger om, hvordan fiske- og vandprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for teststof og fedtindhold (hvis bestemt).

3.4. RESULTATER

— resultater af eventuelle indledende undersøgelser

— dødelighed for kontrolfiskene og fiskene i de enkelte testkamre samt eventuelt iagttaget unormal adfærd

— fiskenes fedtindhold (hvis bestemt i forbindelse med testen)

— kurver (og alle måledata), der viser optagelse og udskillelse af teststoffet i fiskene, samt tiden til ligevægt

▼B

— $C_f$ og $C_w$ (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) for alle udtagne prøver ($C_f$ anføres i µg pr. g våd vægt (ppm), enten legemsvægt eller vægt af et bestemt væv, f.eks. fedtvæv, og $C_w$ µg/ml (ppm)); $C_w$-værdier for kontrolgruppen (også baggrundsværdier oplyses)

— ligevægtsbiokoncentreringsfaktoren ($BCF_{SS}$) og/eller den kinetiske koncentreringsfaktor ($BCF_k$) og i relevante tilfælde 95 % konfidensgrænser for hastighedskonstanter for optagelse og udskillelse (alle udtrykt i forhold til fiskenes legemsvægt eller fiskenes eller de specificerede vævs fedtindhold), konfidensgrænser og standardafvigelse (hvis de foreligger samt beregnings- og dataanalysemetoder for hver koncentration af teststof

— hvis der er benyttet radioaktivt mærkede stoffer, kan en eventuel akkumulering af påviste metabolitter anføres, hvis det er påkrævet

— alle usædvanlige omstændigheder ved testen, eventuelle afvigelser fra proceduren samt alle andre relevante oplysninger.

Resultater som »ikke påvist ved påvisningsgrænsen« bør ved forudgående metodeudvikling og god tilrettelæggelse af forsøget være indskrænket til et minimum, da sådanne resultater ikke kan benyttes til beregning af hastighedskonstanter.

4. **HENVISNINGER**

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp 117-156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No 3.

(4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l) Analysis of Human Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in »The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation«, Ch. 2.3, Part II. Government Publisching Office, The Hague, The Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C, Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp 1431-1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTME E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

*Bilag 1*

**Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding**

| | Stof | Koncentrationsgrænse |
|---|---|---|
| 1 | Partikler | 5 mg/l |
| 2 | Organisk kulstof i alt | 2 mg/l |
| 3 | Ikke-ioniseret ammoniak | 1 µg/l |
| 4 | Restchlor | 10 µg/l |
| 5 | Organophosphorpesticider i alt | 50 ng/l |
| 6 | Organochlorpesticider i alt plus polychlorerede biphenyler | 50 ng/l |
| 7 | Organisk chlor i alt | 25 ng/l |
| 8 | Aluminium | 1 µg/l |
| 9 | Arsen | 1 µg/l |
| 10 | Chrom | 1 µg/l |
| 11 | Cobalt | 1 µg/l |
| 12 | Kobber | 1 µg/l |
| 13 | Jern | 1 µg/l |
| 14 | Bly | 1 µg/l |
| 15 | Nikkel | 1 µg/l |
| 16 | Zink | 1 µg/l |
| 17 | Cadmium | 100 ng/l |
| 18 | Kviksølv | 100 ng/l |
| 19 | Sølv | 100 ng/l |

▼B

*Bilag 2*

**Anbefalede testfiskearter**

| | Anbefalet art | Anbefalet test-temperaturinterval ( °C) | Anbefalet størrelse af testfisk (længde i cm) |
|---|---|---|---|
| 1 | Danio rerio ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) zebrafisk | 20-25 | 3,0 ± 0,5 |
| 2 | Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Fathead minnow | 20-25 | 5,0 ± 2,0 |
| 3 | Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karpe | 20-25 | 5,0 ± 3,0 |
| 4 | Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) japansk risfisk | 20-25 | 4,0 ± 1,0 |
| 5 | Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) guppy | 20-25 | 3,0 ± 1,0 |
| 6 | Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) | 20-25 | 5,0 ± 2,0 |
| 7 | Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) regnbueørred | 13-17 | 8,0 ± 4,0 |
| 8 | Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) trepigget hundestejle | 18-20 | 3,0 ± 1,0 |

([1]) Meyer, A., Orti G. (1993) Proc, Royal Society of London. Series B., Vol. 252, p. 231.

I forskellige lande benyttes der en række brakvands- og saltvandsarter, f.eks.

| | |
|---|---|
| Trommefisk | Leiostomus xanthurus |
| Sheepshead minnow | Cyprinodon variegatus |
| Stribefisk | Menidia beryllina |
| Shiner perch | Cymatogaster aggregata |
| English sole | Parophrys vetulus |
| Staghjorn sculpin | Leptocottus armatus |
| Trepigget hundestejle | Gasterosteus aculeatus |
| Havaborre | Dicentracus labrax |
| Løje | Alburnus alburnus |

**Samling**

De i ovenstående tabel opregnede ferskvandsfisk er lette at opdrætte og/eller fremskaffe hele året, mens saltvands- og brakvandsarterne til dels kun findes i bestemte lande. De kan opdrættes enten i fiskefarme eller i laboratoriet under kontrollerede forhold med hensyn til sygdomme og parasitter, så testdyrene er sunde og af kendt afstamning. Disse fisk kan fås over det meste af verden.

▼B

*Bilag 3*

**Forudsigelse af længden af optagelsesfasen og udskillelsesfasen**

1. *Forudsigelse af optagelsesfasens længde*

Før testen udføres, kan man ud fra en empirisk sammenhæng mellem $k_2$ og n-octanol/vand fordelingskoefficienten ($P_{ow}$) eller $k_2$ og opløseligheden i vand (s) foretage et skøn over $k_2$ og dermed en procentdel af den tid, der vil være påkrævet til at nå ligevægt.

Eksempelvis kan $k_2$ (dag $^{-1}$) skønnes ved hjælp af følgende empiriske udtryk (1):

$\log_{10}k_2 = -0{,}414\ \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47\ (r^2 = 0{,}95)$ [ligning 1]

Andre udtryk, se henvisning (2).

Hvis fordelingskoefficienten ikke er kendt, kan denne skønnes (3) ud fra stoffets opløselighed i vand (s) ifølge udtrykket:

$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862\ \log_{10}(s) + 0{,}710\ (r^2 = 0{,}994)$ [ligning 2]

hvor

s = opløseligheden (mol/l) : (n = 36)

Disse sammenhænge gælder kun for stoffer med log $P_{ow}$-værdier mellem 2 og 6,5 (4).

Den tid, der går til en bestemt procent af ligevægt, kan beregnes ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik) ved at anvende $k_2$-skønnet:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

eller hvis $C_w$ er konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[ligning 3]}$$

Når der er næsten ligevægt ($t \rightarrow \infty$), kan ligning 3 reduceres til (5) (6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ eller } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Da er $k_1/k_2 \cdot C_w$ en tilnærmelse til koncentrationen i fiskene ved »ligevægt« ($C_{f,s}$).

Ligning 3 kan omskrives til:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ eller } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[ligning 4]}$$

Ved at anvende ligning 4 kan man forudsige, hvor lang tid der går indtil en vis procent af ligevægt er nået, når $k_2$ allerede er skønnet ved hjælp af ligning 1 eller 2.

▼B

Som rettesnor kan anføres, at den statistisk optimale længde af optagelsesfasen, når der ønskes statistisk acceptable data ($BCF_k$), er den tid, der går, indtil kurven over logaritmen til koncentrationen af teststoffet i fiskene mod tiden har nået sit midtpunkt, dvs. ved $1,6/k_2$ svarende til 80 % ligevægt, men ikke over $3,0/k_2$ svarende til 95 % ligevægt (7).

Den tid, der går indtil 80 % ligevægt, er (ligning 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ eller } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad \text{[ligning 5]}$$

Tilsvarende for 95 % ligevægt:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad \text{[ligning 6]}$$

For eksempel vil optagelsesfasens længde (up) for et teststof med $P_{ow}$ = 4 være (ligning 1, 5 og 6):

$\log_{10} k_2 = -0,414.(4) + 1,47$ $\quad k_2 = 0,652$ dag$^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,652, i.e. 2,45 dag (59 timer)

eller up (95 %) = 3,0/0,652, i.e. 4,60 dag (110 timer)

Tilsvarende vil optagelsesfasens for et teststof med s = $10^{-5}$ mol/l (log(s) = – 5,0) være (ligning 1, 2, 5 og 6)

$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_2 = 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246$ dag$^{-1}$

up (80 %) = 1,6/0,246, i.e. 6,5 dage (156 timer)

eller up (95 %) = 3,0/0,246, i.e. 12,2 dage (293 timer)

Alternativt kan undtrykket:

$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31$ (timer)

benyttes til beregning af, hvor lang tid der går til faktisk ligevægt (4).

2. *Forudsigelse af udskillelsesfasens længde*

Ud fra det generelle udtryk, der beskriver optagelses- og udskillelseskinetikken (førsteordenskinetik), kan man ligeledes forudsige, hvor lang tid der kræves for, at legemsbelastningen falder til en vis procentdel af begyndelseskoncentrationen (1) (8).

I udskillelsesfasen antages $C_w$ at være nul. Udtrykket kan da reduceres til:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ eller } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

hvor $C_{f,o}$ er koncentrationen ved udskillelsesperiodens begyndelse. 50 % udskillelse vil da være nået til tidspunktet ($t_{50}$):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ eller } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Tilsvarende vil 95 % udskillelse være nået ved:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Hvis der i den første periode benyttes 80 % optagelse ($1,6/k_2$), og der i udskillelsesfasen benyttes 95 % tab ($3,0/k_2$), bliver udskillelsesfasen omtrent dobbelt så lang som optagelsesfasen.

Det er vigtigt at bemærke, at skønnene er baseret på antagelsen om førsteordenskinetik for optagelse og udskillelse. Er denne forudsætning tydeligvis ikke opfyldt, må der tages mere komplekse modeller i brug (f.eks. henvisning 1).

**Henvisning (**til bilag 3**)**

(1) Spacie, A. and Hamelink, J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.

(2) Kristensen, P, (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou, C.T. and Schmedding, D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.

(4) Hawker, D.W. and Connell, D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.

(5) Branson, D.R., Blau, G.E., Alexander, H.C. and Neely, W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

(6) Ernst, W. (1985) Accumulation in aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Sheehman, P., Korte, F., Klein, W. and Bourdeau P.H. (red) Part 4.4, pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly, P.M., Bajramovic, R, Blau, G.E., Branson, D.R. and Sauerhof, f M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kenetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

(8) Könemann, H. and Van Leeuwen, K, (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp 3-19.

▼B

*Bilag 4*

**Teoretisk eksempel på prøveudtagningsplan for biokoncentreringstest af stoffer med log $P_{ow}$ = 4**

| Fiskeprøve | Tidspunkt for prøveudtagningen | | Antal vandprøver | Antal fisk pr. prøve |
|---|---|---|---|---|
| | Mindste hyppighed (dage) | Supplerende prøve | | |
| Optagelsesfasen | – 1<br>0 | | 2 (*)<br>2 | Tilførsel af 45-80 fisk |
| 1. | 0,3 | 0,4 | 2<br>(2) | 4<br>(4) |
| 2. | 0,6 | 0,9 | 2<br>(2) | 4<br>(4) |
| 3. | 1,2 | 1,7 | 2<br>(2) | 4<br>(4) |
| 4. | 2,4 | 3,3 | 2<br>(2) | 4<br>(4) |
| 5. | 4,7 | | 2 | 6 |
| Udskillelsesfasen | | | | Fiskene overføres til vand uden teststof |
| 6. | 5,0 | 5,3 | | 4<br>(4) |
| 7. | 5,9 | 7,0 | | 4<br>(4) |
| 8. | 9,3 | 11,2 | | 4<br>(4) |
| 9. | 14,0 | 17,5 | | 6<br>(4) |

(*) Der udtages vandprøve efter aftapning af mindst tre kammerrumfang vand.

Tallene i parentes angiver, hvor mange prøver (vand, fisk) der skal udtages, hvis der foretages supplerende prøveudtagning.

*Anmærking*: Forud for testen er $k_2$ for en log $P_{ow}$ på 4,0 skønnet til 0,652 $dag^{-1}$. Forsøgets samlede varighed sættes til 3 × up = 3 × 4,6 dage, dvs. 14 dage. For skøn af »up« henvises der til bilag 3.

▼B

*Bilag 5*

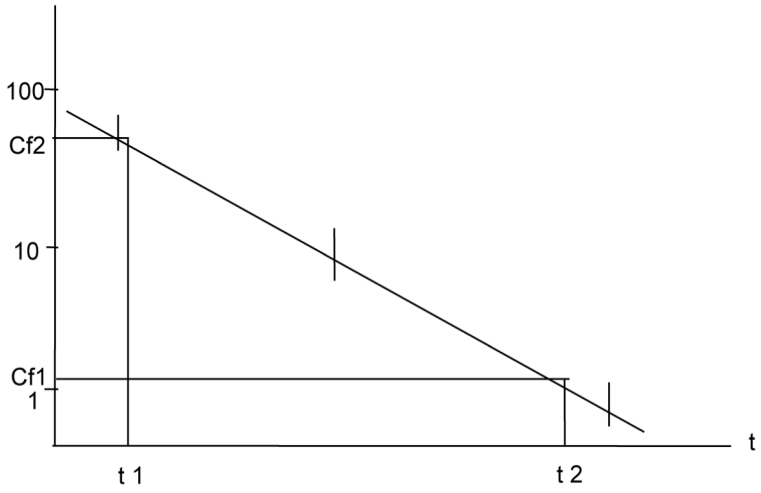
**Modelvalg**

De fleste biokoncentreringsdata antages at kunne beskrives »rimelig« godt ved en simpel model med to dele (»compartments«) og to parametre, hvilket fremgår af den bedste retlinede kurve gennem punkterne for koncentrationen i fisk under udskilielsesfasen, når de afsættes på semilogaritmisk papir. (Hvis punkterne ikke kan beskrives ved en ret linje, må der benyttes mere komplekse modeller, se f.eks. Spacie og Hamelinck, henvisning (1) til bilag 3).

**Grafisk metode til bestemmelse af hastighedskonstanten for udskillelse, $k_2$**

Koncentrationen af teststoffet i hver fiskeprøve afbildes mod tiden på semilogaritmisk papir. Linjen har hældningen $k_2$.

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$




Det skal bemærkes, at afvigelser fra en ret linje kan tyde på, at udskillelsens kinetik er mere kompleks end første orden. Der kan benyttes en grafisk metode til løsning af udskillelse, der ikke har af førsteordens kinetik.

**Grafisk metode til bestemmelse af hastighedskonstanten for optagelse, $k_1$**

På grundlag af $k_2$ beregnes $k_1$ efter udtrykket

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(ligning 1)}$$

Værdien af $C_f$ aflæses ved midtpunktet af den glatte optagelseskurve fra afbildningen af logaritmen til koncentrationen mod tiden (lineært).

▼B

**Computermetode til bestemmelse af hastighedskonstanterne for optagelse og udskillelse**

Til bestemmelse af biokoncentreringsfaktoren og hastighedskonstanterne $k_1$ og $k_2$ foretrækkes det, at der benyttes ikke-lineære estimeringsmetoder på computer. Sådanne programmer finder værdier for $k_1$ og $k_2$ ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og følgende model:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(ligning 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \qquad \text{(ligning 3)}$$

hvor $t_c$ er tidspunktet for afslutningen af optagelsesfasen.

Denne metode giver skøn over standardafvigelser for $k_1$ og $k_2$.

Eftersom $k_2$ i de fleste tilfælde kan skønnes ud fra udskillelseskurven med forholdsvis stor præcision, og der er en stærk korrelation mellem de to parametre $k_1$ og $k_2$, hvis skønnet samtidigt, er det undertiden bedst først at beregne $k_2$, ud fra udskillelsesdataene alene og derefter at beregne $k_1$ ud fra optagelsesdataene ved hjælp af ikke-lineær regression.

▼B

## C.14. VÆKSTTEST PÅ FISKEYNGEL

### 1. METODE

Denne vækstoksicitetstestmetode svarer til OECD TG 215 (2000).

### 1.1. INDLEDNING

Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på væksten hos fiskeyngel, som gennem længere tid eksponeres for kemikalier. Testen er baseret på en metode, som er udviklet og ringtestet (1)(3) inden for den Europæiske Union med henblik på at vurdere virkningerne af kemikalier på væksten hos yngel af regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) under gennemstrømningsbetingelser. Andre veldokumenterede aner kan anvendes. For eksempel har man erfaring fra vækstest med zebrafisk (Danio rerio) ([1]) (3)(4) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (5)(6)(7).

Der henvises også til den generelle indledning til del C.

### 1.2. DEFINITIONER

**Laveste koncentration med observeret effekt (LOEC)** er den laveste koncentration af et testkemikalie, som i testen har vist sig at have en signifikant virkning ($p < 0,05$) i sammenligning med en kontrolgruppe. Dog skal alle testkoncentrationer over LOEC have en skadevirkning, som er lig med eller større end de virkninger, der er observeret ved LOEC.

**Koncentration uden observeret effekt (NOEC)** er testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

$\mathbf{EC_X}$ er ved denne testmetode den koncentration af testkemikaliet, som forårsager en variation i fiskenes tilvækst på x % i sammenligning med kontrolgrupperne.

**Belastningsgraden** er fiskenes vådvægt pr. vandvolumen.

**Bestandtætheden** er antallet af fisk pr. vandvolumen.

**Enkeltfisk-specifik tilvækst** er et udtryk for en enkelt fisks tilvækst på grundlag af fiskens startvægt.

**Beholdergennemsnits-specifik tilvækst** er et udtryk for den gennemsnitlige tilvækst for en beholderpopulation ved én koncentration.

**Pseudo-specifik tilvækst** er et udtryk for den enkelte fisks tilvækst i sammenligning med beholderpopulationens gennemsnitlige startvægt.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

▼B

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Fiskeyngel i den eskponentielle vækstfase vejes og anbringes derefter i testbeholdere og eksponeres for en række subletale koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand, fortrinsvis ved gennemstrømning eller, hvis dette ikke er muligt, under passende semistatiske betingelser (statisk-udskiftning). Testens varighed er 28 dage. Fiskene fodres dagligt. Foderrationen baseres på fiskenes startvægt og kan genberegnes efter 14 dage. Ved testens afslutning vejes fiskene igen. Virkningerne på tilvæksten analyseres ved anvendelse af en regressionsmodel for at beregne den koncentration, som ville forårsage en variation i tilvæksten på x %, dvs. $EC_X$ (f.eks. $EC_{10}$, $EC_{20}$ eller $EC_{30}$). Alternativt kan dataene sammenlignes med kontrolværdierne for at bestemme den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og derudfra koncentrationen uden observeret effekt (NOEC).

1.4. INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

Der bør foreligge resultater fra en akut-toksidtetstest (se testmetode C.1), fortrinsvis udført på den art, som er valgt til denne test. Dette indebærer, at testkemikaliets vandopløselighed og damptryk er kendt, og at der foreligger en pålidelig analysemetode til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og rapporteret nøjagtighed, samt en detektionsgrænse.

Nyttige oplysninger omfatter strukturformlen, kemikaliets renhed, vand- og lysstabilitet, $pK_a$, $P_{ow}$ samt resultater fra en test for umiddelbar biologisk nedbrydelighed (se testmetode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

Testens validitet forudsætter følgende:

— mortaliteten i kontrolgruppen(-erne) må ikke overstige 10 % ved testens afslutning

— den gennemsnitlige vægt af fiskene i kontrolgruppen(-erne) skal være øget tilstrækkeligt til, at detektion af den minimale variation i tilvæksten kan betragtes som signifikant. En ringtest (2) har vist, at for regnbueørreders vedkommende skal gennemsnitsvægten for fiskene i kontrolgrupperne i løbet af 28 dage være øget med mindst det halve (dvs. 50 %) af deres gennemsnitlige startvægt; f.eks. startvægt: 1 g/fisk (= 100 %), slutvægt efter 28 dage: ≥ 1,5 g/fisk (≥ 150 %)

— koncentrationen af opløst ilt skal gennem hele testperioden have været mindst 60 % af værdien for luftmætning (ASV)

— vandtemperaturen må ikke på noget tidspunkt i løbet af testen variere med mere end 1 °C mellem testbeholdeme og skal holdes inden for 2 °C omkring de temperaturintervaller, der er specificeret for de arter, der anvendes i testen (tillæg 1).

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Normalt laboratorieudstyr og i særdeleshed følgende:

— ilt- og pH-måleudstyr

▼B

— udstyr til bestemmelse af vandets hårdhed og alkalinitet

— egnet apparatur til temperaturkontrol og fortrinsvis kontinuerlig overvågning

— beholdere fremstillet af et kemisk inaktivt materiale og med passende kapacitet i forhold til den anbefalede belastningsgrad og bestandtæthed (se 1.8.5 og tillæg 1)

— vægt med tilstrækkelig nøjagtighed (dvs. nøjagtighed på ± 0,5 %).

1.6.2. **Vand**

Som testvand kan anvendes vand af enhver beskaffenhed, hvori den art, der anvendes i testen, udviser passende langtidsoverlevelse og vækst. Vandets kvalitet skal være ensartet i hele testperioden. Vandets pH skal ligge inden for området fra 6,5 til 8,5, men bør i løbet af en given test ligge inden for et område på ± 0,5 pH-enheder. En hårdhedsgrad på over 140 mg/l (som $CaCO_3$) anbefales. For at sikre, at fortyndingsvandet ikke får urimelig indflydelse på testresultatet (f.eks. ved dannelse af et kompleks med testkemikaliet), skal der regelmæssigt udtages prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), de vigtigste anioner og kationer (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og $SO_4$, pesticider (f.eks. samlet mængde phosphor- og chlorholdige organiske pesticider), samlet mængde organisk kulstof og opslæmmet tørstof skal foretages, f.eks. hver tredje måned, såfremt man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant gennem mindst ét år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med længere intervaller (f.eks. hver sjette måned). I tillæg 2 er anført nogle kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand.

1.6.3. **Testopløsninger**

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved mekanisk opblanding eller omrystning af testkemikaliet i fortyndingsvandet (f.eks. ved omrøring eller ultralydbehandling). Mætningssøjler (opløselighedssøjler) kan anvendes for at opnå en passende koncentration i stamopløsningen.

Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler (opløselighedsfremmere) kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Eksempler på egnede opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid og triethylenglycol. Eksempler på egnede dispergeringsmidler er Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Man skal udvise forsigtighed ved anvendelse af stoffer, der er umiddelbart biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller meget flygtige, idet de ved gennemstrømnmgstest kan give anledning til problemer med bakteriebelægninger. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må dette ikke have nogen signifikant virkning på fiskenes vækst eller synlig negativ virkning på fiskeyngelen, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes.

▼B

Til gennemstrømningstest kræves et system, som kontinuerligt doserer og fortynder en stamopløsning af testkemikaliet (f.eks. udmålingspumpe, proportionalfortynder, mætningssystem), så der afgives en række forskellige koncentrationer til testbeholderne. Stamopløsningernes og fortyndingsvandets strømningshastigheder skal i løbet af testen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og må ikke variere mere end 10 % gennem hele testforløbet. En ringtest (2) har vist, at en vandudskiftningshyppighed på 6 l pr. g fisk pr. døgn i løbet af testen er passende for regnbueørreds vedkommende (se 1.8.2.2).

Til semistatiske (udskiftnings-) test vil medieudskiftningshyppigheden være afhængig af testkemikaliets stabilitet; men det anbefales at udskifte vandet hver dag. Hvis det på baggrund af præliminære stabilitetstest (se 1.4) har vist sig, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. ligger uden for området på 80-120 % af den nominelle værdi, eller under 80 % af den målte startkoncentration) i udskiftningstidsrummet, bør man overveje at anvende en gennemstrømningstest.

1.6.4. **Valg af fiskeart**

Regnbueørred (Oncorhynchus mykiss) er den anbefalede art til denne test, idet man har mest erfaring fra ringtest med denne art (1)(2). Andre veldokumenterede arter kan dog anvendes; men testproceduren må eventuelt tilpasses, så man opnår de bedst egnede testbetingelser. For eksempel har man også erfaring med zebrafisk (Danio rerio) (3)(4) og riskarpe (medaka, Oryzias latipes) (5)(6)(7). En begrundelse for valget af art og testmetode skal i så fald anføres.

1.6.5. **Opbevaring af fiskene**

Testfiskene skal udvælges fra en population af en enkelt bestand, fortrinsvis fra samme gydning, som i mindst to uger forud for testen holdes under vandkvalitets- og lysbetingelser, som svarer til de i testen anvendte. Fiskene skal fodres med en minimumsration på 2 % af kropsvægten pr. dag, og fortrinsvis 4 % af kropsvægten pr. dag, gennem hele opbevaringsperioden og under testen.

Efter en akklimatiseringsperiode på 48 timer registreres mortaliteten, og følgende kriterier bringes i anvendelse:

— mortalitet på mere end 10 % af populationen på syv dage: Hele fiskegruppen kasseres

— mortalitet på mellem 5 % og 10 % af populationen: akklimatisering i yderligere syv dage, og hvis mortaliteten er over 5 % i løbet af de følgende syv dage, kasseres hele fiskegruppen

— mortalitet på mindre end 5 % af populationen på syv dage: Fiskegruppen godkendes.

I de to uger forud for testen eller under testen bør fiskene ikke behandles for sygdomme.

▼B

1.7. TESTDESIGN

»Testdesignet« vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal beholdere med hvert koncentrationsniveau samt antal fisk pr. beholder. Optimalt bør testedesignet vælges under hensyntagen til:

— undersøgelsens formål

— den anvendte statistiske analysemetode

— forsøgsressourcernes tilgængelighed og pris.

Beskrivelsen af formålet bør, om muligt, angive den statistiske opløsningsgrad, ved hvilken en given forskels-størrelse (f.eks. i tilvækst) skal detekteres, eller alternativt den nøjagtighed, hvormed $EC_x$ (f.eks. hvor x = 10, 20 eller 30, og fortrinsvis ikke mindre end 10) skal beregnes. Dette er en forudsætning for, at undersøgelsens omfang kan fastlægges med sikkerhed.

Det er vigtigt at forstå, at et design, som er optimalt (giver den bedste udnyttelse af ressourcerne) til brug i forbindelse med én statistisk analysemetode, ikke nødvendigvis er optimalt ved en anden metode. Det design, der anbefales til vurdering af LOEC/-NOEC, vil derfor ikke være det samme som det, der anbefales til brug ved regressionsanalyse.

I de fleste tilfælde foretrækkes regressionsanalyse frem for variansanalyse, af årsager, som Stephan og Rogers (8) har gjort rede for. Hvor der imidlertid ikke foreligger nogen egnet regressionsmodel, bør ($r^2 < 0,9$) NOEC/LOEC anvendes.

1.7.1. **Design for regressionsanalyse**

Følgende punkter er vigtige at tage i betragtning, når en test skal designes til regressionsanalyse:

— Testen må nødvendigvis omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{10,20,30}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer vil være mest nøjagtig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. En præliminær test til bestemmelse af dette område kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende.

— For at man skal kunne opstille en fyldestgørende statistisk model, skal testen omfatte mindst én kontrolbeholder og fem yderligere beholdere med forskellige koncentrationer. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, og hvor det er aktuelt, bør der i tillæg til testrækken udføres en test på én kontrolbeholder indeholdende opløselighedsfremmeren i den højeste testkoncentration (se 1.8.3 og 1.8.4).

— En passende geometrisk eller logaritmisk progression (9) (se tillæg 3) kan anvendes. Logaritmiske progressioner mellem testkoncentrationerne er at foretrække.

▼B

— Hvis man har mere end seks beholdere til rådighed, bør de ekstra beholdere enten anvendes til replikation eller fordeles inden for koncentrationsområdet, så der bliver mulighed for mindre intervaller mellem niveauerne. Disse to muligheder er lige ønskelige.

1.7.2. **Design for vurdering af NOEC/LOEC ved anvendelse af variansanalyse (ANOVA)**

Fortrinsvis bør der være replikatbeholdere for hver enkelt koncentration, og statistiske analyser bør foretages på beholderniveau (10). Hvis man ikke har replikatbeholdere, kan man ikke tage højde for variabiliteten mellem beholdere, ud over hvad der må tilskrives enkeltfisk. Man har imidlertid erfaret (11), at variabiliteten mellem beholdere har været meget lille i sammenligning med variabiliteten inden for beholderen (dvs. mellem enkeltfisk) i det undersøgte tilfælde. Det er derfor et relativt acceptabelt alternativ at udføre statistisk analyse på enkeltfiskniveau.

Normalt anvendes mindst fem testkoncentrationer i en geometrisk progression med en faktor, som ikke overstiger 3.2.

Når testene udføres med replikatbeholdere, bør antallet af replikatkontrolbeholdere, og dermed antallet af fisk, almindeligvis være det dobbelte for hver af testkoncentrationerne, som bør omfatte samme antal (12)(13)(14). Hvis man derimod ikke har replikatbeholdere, bør der være lige så mange fisk i kontrolgruppen som i hver af restkoncentrationerne.

Hvis ANOVA skal baseres på beholdere i stedet for enkeltfisk (hvilket vil indebære enten, at hver enkelt fisk skal mærkes, eller anvendelse af »pseudo«-specifik tilvækst (se 2.1.2)), vil det være nødvendigt med tilstrækkeligt mange replikatbeholdere til, at standardafvigelsen for »beholdere inden for koncentrationerne« kan bestemmes. Dette betyder, at fejlfrihedsgraden i variansanalysen bør være mindst fem (10). Hvis kun kontrolgrupperne replikeres, vil der være en risiko for skævhed i fejlvariabiliteten, idet denne kan stige, når middelværdien for den pågældende tilvækst stiger. Eftersom det er sandsynligt, at tilvæksten vil falde, når koncentrationen øges, vil dette give en tilbøjelighed til overvurdering af variabiliteten.

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Udvælgelse og vejning af testfisk**

Det er vigtig: a: minimere variationen i fiskenes vægt ved testens begyndelse. Egnede størrelser for de forskellige fiskearter, der anbefales til brug i denne test. er angivet i tillæg 1. For hele gruppen af fisk, der bruges i testen, gælder det, at området for individuel vægt ved testens begyndelse ideelt bør holdes inden for ± 10 % af gennemsnitsvægten og må under ingen omstændigheder overstige 25 %. Det anbefales at veje en delprøve af fisk inden testen for at beregne gennemsnitsvægten.

▼B

Stampopulationen bør ikke fodres i 24 timer forud for testens begyndelse. Derpå bør fiskene vælges tilfældigt. Ved anvendelse af et totalbedøvende middel (f.eks. en vandig opløsning af 100 mg/l tricainmethansulfonat (MS 222) neutraliseret ved tilsætning af to dele natriumbicarbonat pr. del MS 222) bør fiskene vejes enkeltvis som vådvægt (duppes tørre) med den nøjagtighed, som er anført i tillæg 1. De fisk, hvis vægt ligger inden for det ønskede område, tages fra og fordeles derpå tilfældigt mellem testbeholderne. Den samlede vådvægt af fisk i hver testbeholder registreres. Både anvendelsen af bedøvelsesmidlet og håndteringen af fiskene (herunder aftørring og vejning) kan give anledning til stress og beskadigelser af fiskeyngelen, i særdeleshed hvor det drejer sig om de arter, der er små af størrelse. Derfor skal håndteringen af fiskeyngelen foretages med den yderste forsigtighed for at undgå at stresse og beskadige testfiskene.

Fiskene vejes igen på testens 28. dag (se 1.8.6). Hvis det imidlertid skønnes nødvendigt at genberegne foderrationen, kan fiskene vejes igen på testens 14. dag (se 1.8.2.3). Andre metoder, som f.eks. en fotografisk metode, vil kunne anvendes for at bestemme ændringer i fiskenes størrelse, og foderrationerne vil så kunne justeres ud fra dette.

1.8.2. **Eksponeringsbetingelser**

1.8.2.1. *Varighed*

Testens varighed er ≥ 28 dage.

1.8.2.2. *Belastningsgrad og bestandtæthed*

Det er vigtigt, at belastningsgraden og bestandtætheden er passende for den fiskeart, der bruges i testen (se tillæg 1). Hvis bestandtætheden er for stor, vil der opstå stress på grund af trængsel, hvilket vil føre til reduceret tilvækst og øget risiko for sygdomme. Hvis bestandtætheden er for lav, kan det medføre territorialadfærd, hvilket også vil kunne indvirke på væksten. Under alle omstændigheder skal belastningsgraden være så lav, at der kan opretholdes en koncentration af opløst ilt på mindst 60 % ASV uden beluftning. For regnbueørreders vedkommende har man ved en ringtest (2) påvist, at en belastningsgrad på 16 ørreder a 3-5 g i et volumen på 40 liter er acceptabel. Den anbefalede hyppighed for udskiftning af vandet under testen er 6 l pr. g fisk pr. dag.

1.8.2.3. *Fodring*

Fiskene skal fodres med et passende foder (tillæg 1) og tilstrækkeligt ofte til at frembringe en acceptabel tilvækst. Man må udvise omhu for at undgå mikrobiel vækst og urenheder i vandet. For regnbueørreders vedkommende vil en fodertilførsel på 4 % af kropsvægten pr. dag som regel opfylde disse betingelser (2)(15)(16)(17). Den daglige foderration kan deles i to lige store portioner, som gives fiskene ved to daglige fodringer med mindst fem timers mellemrum. Rationen baseres på fiskenes samlede startvægt i hver enkelt testbeholder. Hvis fiskene vejes igen på testens 14. dag, genberegnes rationen ud fra denne vægt. Fiskene bør ikke fodres i 24 timer inden vejningen.

▼B

Foderrester og fækalmateriale skal hver dag fjernes fra testbeholderne ved omhyggelig rengøring af bunden i hver enkelt beholder ved hjælp af opsugning.

1.8.2.4. *Lys og temperatur*

Lysperioderne og vandtemperaturen skal passe til den art, der bruges i testen (tillæg 1).

1.8.3. **Testkoncentrationer**

Normalt kræves, uanset testens design, fem koncentrationer af testkemikaliet (se 1.7.2). Forudgående kendskab til testkemikaliets toksicitet (f.eks. fra akut-testning og eller fra »range finding tests«) vil være nyttigt ved udvælgelsen af passende testkoncentrationer. Begrundelse skal anføres, hvis der anvendes færre end fem koncentrationer. Den højeste testkoncentration må ikke overstige kemikaliets opløselighedsgrænse i vand.

Når der anvendes en opløselighedfremmer som hjælpemiddel ved fremstillingen af stamopløsninger, må dens slutkoncentration ikke være højere end 0,1 ml/l og bør fortrinsvis være den samme i alle testbeholdere (se 1.6.3). Anvendelse af sådanne stoffer skal imidlertid så vidt muligt undgås.

1.8.4. **Kontrolprøver**

Antallet af fortyndingsvand-kontrolprøver afhænger af testens design (se 1.7-1.7.2). Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer, skal der desuden foretages det samme antal opløselighedsfremmer-kontrolprøver som fortyndingsvand-kontrolprøver.

1.8.5. **Hyppighed af analyser og målinger**

Under testen måles koncentrationerne af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum (se nedenfor).

Ved gennemstrørnningstest skal strømningshastighederne for fortyndingsmidlet og giftstofstamopløsningen kontrolleres regelmæssigt, fortrinsvis dagligt, og de må ikke udvise en variation på mere end 10 % gennem hele testperioden. Hvis testkemikaliets koncentrationer forventes at ligge inden for ± 20 % af de nominelle værdier (dvs. inden for området fra 80 til 120 % — se 1.6.2 og 1.6.3), anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres ved testens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier (baseret på oplysninger om testkemikaliets stabilitet), vil det være nødvendigt at analysere samtlige testkoncentrationer, men efter samme retningslinjer.

Ved semistatiske (udskiftnings-) test, hvor testkemikaliets koncentration forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, anbefales det som et minimum, at den højeste og den laveste testkoncentration analyseres, når de lige er fremstillet og umiddelbart inden udskiftning, ved undersøgelsens begyndelse og hver uge derefter. Ved test, hvor testkemikaliets koncentration ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier, skal samtlige testkoncentrationer analyseres efter samme retningslinjer som for mere stabile kemikalier.

▼B

Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan påvises, at testkemikaliets koncentration i tilstrækkelig grad har holdt sig inden for ± 20 % af de nominelle værdier eller den målte startkoncentration gennem hele testen, kan resultaterne baseres på de nominelle eller de målte værdier.

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere prøverne (f.eks. med et filter med en porestørrelse på 0,45 μm). Det anbefales at centrifugere prøverne; men hvis testmaterialet ikke adsorberer på filteret, kan også filtrering accepteres.

Under testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i samtlige testbeholdere. Samlet hårdhedsgrad, alkalinitet og saltindhold (hvis dette er aktuelt) skal måles i kontrolbeholderne og i én beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis aktuelt) måles tre gange (ved testens begyndelse, midte og afslutning). Ved semistatiske test anbefales, at opløst ilt måles hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst én gang om ugen. pH skal måles ved begyndelsen og afslutningen af hver vandudskiftning ved statiske udskiftningstest og mindst én gang ugentligt ved gennemstrømningstest. Hårdhedsgrad og alkalinitet skal måles én gang i hver test. Temperaturen skal fortrinsvis overvåges kontinuerligt i mindst én testbeholder.

1.8.6. **Observationer**

Vægt: Ved testens afslutning skal samtlige overlevende fisk vejes som vådvægt (duppes tørre), enten gruppevis pr. testbeholder eller enkeltvis. Vejning af fisk pr. testbeholder foretrækkes frem for individuel vejning, som kræver, at hver enkelt fisk skal mærkes. Hvis fiskene skal vejes enkeltvis med henblik på bestemmelse af enkeltfisk-specifik tilvækst, skal man vælge en mærkningsmåde, som undgår at stresse fiskene (der er egnede alternativer til frysemærkning, f.eks. anvendelse af tynd farvet fiskesnøre).

Fiskene skal i løbet af testperioden undersøges dagligt for eventuelle ydre abnormiteter (såsom blødninger eller misfarvning), og unormal adfærd registreres. Eventuelle mortaliteter skal registreres, og døde fisk skal fjernes hurtigst muligt. Døde fisk erstattes ikke. idet belastningsgraden og bestandtætheden er tilstrækkelige til. at indvirkninger på væksten som følge af ændringer i fiskeantallet pr. beholder undgås. Fodermængden skal imidlertid justeres.

## 2. DATA OG RAPPORTERING

### 2.1. BEHANDLING AF RESULTATERNE

Det anbefales, at en statistiker inddrages i både design og analyse af testen, eftersom denne testmetode tillader betydelige variationer i forsøgets design, som f.eks. antal testbeholdere, antal testkoncentrationer, antal fisk osv. I betragtning af valgmulighederne med hensyn til testens design vil der ikke blive givet nogen vejledning i statistiske procedurer her.

▼B

Tilvæksten bør ikke beregnes for testbeholdere, hvor mortaliteten overstiger 10 %. Mortalitetsprocenten skal imidlertid anføres for samtlige testkoncentrationers vedkommende.

Uanset hvilken metode, der anvendes til dataanalysen, er det centrale koncept den specifikke tilvækst r mellem tidspunktet $t_1$ og tidspunktet $t_2$. Denne kan defineres på flere måder afhængigt af, hvorvidt fiskene er mærket individuelt, eller hvorvidt der ønskes et beholdergennemsnit.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

hvor:

$r_1$ = enkeltfisk-specifik tilvækst

$r_2$ = beholdergennemsnitsspecifik tilvækst

$r_3$ = »pseudo«-specifik tilvækst

$w_1$, $w_2$ = en bestemt fisks vægt på henholdsvis tidspunkt $t_1$ og $t_2$

$\log_e w_1$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens begyndelse

$\log_e w_2$ = logaritmen til en enkelt fisks vægt ved testperiodens afslutning

$\log_e W_1$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne $w_1$ for fiskene i beholderen ved testperiodens begyndelse

$\log_e W_2$ = gennemsnit af logaritmerne til værdierne $w_2$ for fiskene i beholderen ved testperiodens afslutning

$t_1$, $t_2$ = tidspunktet (dag) for testperiodens begyndelse og afslutning

$r_1$, $r_2$, $r_3$ kan udregnes for tidsrummet mellem 0 og 28 dage og, hvor det er aktuelt (dvs. når der er foretaget måling på dag 14), for tidsrummene mellem 0 og 14 samt mellem 14 og 28 dage.

2.1.1. **Resultatanalyse ved regression (koncentrationsrespons-model)**

Denne analysemetode fører frem til en passende matematisk sammenhæng mellem den specifikke tilvækst og koncentrationen og gør det således mulig: at beregne »$EC_x$«, dvs. en hvilken som helst ønsket EC-værdi. Ved anvendelse af denne metode er udregningen af r for enkeltfisk ($r_1$) ikke nødvendig, og analysen kan i stedet baseres på r-beholdergennemsnitsværdien ($r_2$). Sidstnævnte metode foretrækkes. Den er også mest hensigtsmæssig, hvor den mindste fiskeart bruges.

Den beholdergennemsnitsspecifikke tilvækst ($r_2$) bør plottes grafisk som funktion af koncentrationen, for at forholdet mellem koncentration og respons kan undersøges.

▼B

Når forholdet mellem $r_2$ og koncentration skal vises, bør man vælge en passende model, og valget skal begrundes på hensigtsmæssig vis.

Hvis der ikke er lige mange overlevende fisk i de enkelte beholdere, bør modeltilpasningsmetoden vægtes, hvad enten denne er simpel eller nonlineær, for at tage højde for grupper af uens størrelse.

Modeltilpasningsmetoden skal give mulighed for, at en beregning af f.eks. $EC_{20}$ og dennes fordeling (enten standardfejl eller konfidensinterval) kan udledes. Grafen for den tilpassede model bør vises i forhold til dataene, så modeltilpasningens tilstrækkelighed tydeligt fremgår (8)(18)(19)(20).

2.1.2. **Analyse af resultaterne for beregningen af LOEC**

Hvis testen har omfattet replikation af samtlige beholdere ved samtlige koncentrationsniveauer, vil beregningen af LOEC kunne baseres på en variansanalyse (ANOVA) af den beholdergennemsnitsspecifikke tilvækst (se 2.1), efterfulgt af en egnet metode (f.eks. Dunnetts eller Williams' test (12)(13)(14){21)) til sammenligning af det gennemsnitlige r for hver enkelt koncentration med det gennemsnitlige r for kontrolgrupperne, for at identificere den laveste koncentration, ved hvilken denne forskel er signifikant på et sandsynlighedsniveau på 0,05. Hvis de nødvendige forudsætninger for parametriske metoder ikke er opfyldt — ikke-normal fordeling (f.eks. Shapiro-Wilks test) eller heterogen varians (Bartletts test) — bør man overveje at transformere dataene for at homogenisere varianserne, inden ANOVA foretages, eller at foretage en vægtet ANOVA.

Hvis testen ikke har omfattet replikation af beholdere ved hver enkelt koncentration, vil en ANOVA, der baseres på beholdere, være ikke-udslagsgivende eller umulig. I denne situation vil det være et acceptabelt kompromis at basere ANOVA på den »pseudo«-specifikke tilvækst $r_3$ for enkeltfisk.

Det gennemsnitlige $r_3$ for hver enkelt testkoncentration kan så sammenlignes med det gennemsnitlige $r_3$ for kontrolgrupperne. Derpå kan LOEC identificeres som tidligere beskrevet. Man må forstå, at denne metode hverken tager hensyn til eller yder beskyttelse mod variabilitet mellem beholdere, ud over hvad der kan tilskrives variabiliteten mellem enkeltfisk. Erfaringerne har imidlertid vist (8), at variabilitet mellem beholdere har været meget lille sammenlignet med variabiliteten inden for de enkelte beholdere (dvs. mellem fisk). Hvis analysen ikke omfatter enkeltfisk, skal det med begrundelse anføres, hvilken metode der er benyttet til identifikation af ekstreme værdier.

2.2. TOLKNING AF RESULTATERNE

Resultaterne skal tolkes med forsigtighed, hvor den målte koncentration af giftstof i testopløsningeme ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, eller ved semistatiske test, hvor testkemikaliets koncentration i den nyligt fremstillede opløsning falder inden udskiftningen.

2.3. TESTRAPPORTEN

Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

▼B

2.3.1. **Testkemikaliet:**

— fysisk beskaffenhed og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identifikationsdata, herunder renhedsgrad og eventuelt analysemetode til kvantitativ bestemmelse af testkemikaliet.

2.3.2. **Fiskeart(er), der indgår i testen:**

— videnskabeligt navn, og eventuelt

— stamme, størrelse, leverandør, evt. forudgående behandling osv.

2.3.3. **Testbetingelser:**

— anvendt testprocedure (f.eks. semistatisk/udskiftning. gennemstrømning, belastning, bestandtæthed osv.)

— testdesign (f.eks. antal testbeholdere, testkoncentrationer og replikater, antal fisk pr. beholder)

— metode til fremstilling af stamopløsmnger samt udskiftningshyppighed (eventuelt anvendt opløselighedsfremmer og dennes koncentration skal anføres)

— de nominelle testkoncentrationer, de målte værdiers gennemsnit og standardafvigelser i testbeholderne, metoden, hvorved de er opnået, samt dokumentation for, at målingerne refererer til testkemikaliets faktiske koncentration i opløsning

— fortyndingsvandets karakteristika: pH, hårdhedsgrad, alkalinitet, temperatur, koncentration af opløst ilt, restindhold af chlor (hvis målt), samlet mængde organisk kulstof, opslæmmet tørstof, testmediets saltindhold (hvis målt) og samtlige andre udførte målinger

— vandkvaliteten i testbeholderne: pH, hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt

— detaljerede oplysninger om fodring (f.eks. fodertype(r), -kilde, -mængde og fodringshyppighed).

2.3.4. **Resultater:**

— dokumentation for, at kontrolgrupperne opfylder validitetskritenet for overlevelse, samt data vedrørende mortaliteten ved de enkelte testkoncentrationer

— anvendte statistiske analyseteknikker, statistikker baseret på replikater eller fisk, behandling af data og begrundelse for de anvendte teknikker

— data i tabelform vedrørende fiskenes individuelle og gennemsnitlige vægt på dag 0, 14 (hvis aktuelt) og 28, værdier for beholdergennemsnits- eller pseudospecifik tilvækst (alt efter hvad der er aktuelt) i tidsrum met fra dag 0 til 28 eller eventuelt 0-14 og 14-28

— resultater af den statistiske analyse (dvs. regressionsanalyse eller ANOVA), fortrinsvis i tabelform og grafisk form, og LOEC ($p = 0,05$) og NOEC eller $EC_x$, eventuelt med standardfejl, alt efter hvad der er aktuelt

▼B

— forekomst af eventuelle usædvanlige reaktioner hos fiskene samt eventuelle synlige virkninger frembragt af testkemikaliet.

3. HENVISNINGER

(1) Solbe, J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Ashley, S., Mallett, M.J. and Grandy, N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland, N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Nagel, R., Bresh, H., Caspers, N., Hansen, P.D., Market, M., Munk, R., Scholz, N. and Höfte, B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, pp 157-164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka *(Oryzias latipes).*Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, pp 287-297.

(7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka *(Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

(8) Stephan, C.E. and Rogers, J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R.C. Bahner and D.J. Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.

(10) Cox, D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack, S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate offish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.

(12) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

▼B

(14) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville, N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.

(18) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

(20) Norbert-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(21) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

▼B

*Tillæg 1*

**FISKEARTER ANBEFALET TIL TESTNING, OG EGNEDE TESTBETINGELSER**

| Arter | Anbefalet område for testtemperatur (°C) | Lysperiode (timer) | Anbefalet område for fiskenes startvægt (g) | Påkrævet målingsnøjagtighed | Belastningsgrad (g/l) | Bestandtæthed (pr. liter) | Foder | Testens varighed (dage) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Anbefalet art:** | | | | | | | | |
| *Oncorhynchuss mykiss*<br>Regnbueørred | 12,5 - 16,0 | 12-16 | 1-5 | Til nærmeste 100 mg | 1,2 - 2,0 | 4 | Mærkevaretørfoder til laksefiskeyngel | ≥ 28 |
| **Andre veldokumenterede arter:** | | | | | | | | |
| *Danio rerio*<br>Zebrafisk | 21-25 | 12-16 | 0,050 - 0,100 | Til nærmeste 1 mg | 0,2 - 1,0 | 5-10 | Levende foder (*Brachionus Artemia*) | ≥ 28 |
| *Oryzias latipes*<br>Riskarpe (Medaka) | 21-25 | 12-16 | 0,050 - 0,100 | Til nærmeste 1 mg | 0,2 - 1,0 | 5-20 | Levende foder (*Brachionus Artemia*) | ≥ 28 |

▼B

*Tillæg 2*

**NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND**

| Stof | Koncentrationer |
|---|---|
| Partikler | < 20 mg/l |
| Total organisk kulstof | < 2 mg/l |
| Ammoniak | < 1 µg/l |
| Restchlor | < 10 µg/l |
| Total phosphorholdige organiske pesticider | < 50 ng/l |
| Total chlorholdige organiske pesticider plus polychlorerede biphenyler | < 50 ng/l |
| Total organisk chlor | < 25 ng/l |

▼B

*Tillæg 3*

**Logaritmiske rækker af koncentrationer, der er egnede til toksicitetstest (9)**

| Søjle (antal koncentrationer mellem 100 og 10, eller mellem 10 og 1) ([1]) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

([1]) En række bestående af fem (eller flere) successive koncentrationer kan vælges fra en kolonne. Midterpunkterne mellem koncentrationerne i kolonne (x) findes i kolonne (2x + 1), De anførte værdier kan repræsentere koncentrationer udtrykt i procent pr. volumen eller vægt (mg/l eller µg/l). Værdierne kan multipliceres eller divideres med en hvilken som helst potens af 10, alt efter hvad der er aktuelt. Kolonne 1 kan eventuelt anvendes, hvis der har været betydelig tvivl om toksicitetsniveauet.

▼B

## C.15. FISK, KORTTIDSTOKSICITETSTEST UDFØRT PÅ FISKEEMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL

### 1. METODE

Denne korttids toksicitetstestmetode svarer til OECD TG 212 (1998).

### 1.1. INDLEDNING

Denne korttidstoksicitetstest udført på fiskeembryoner og blommesækyngel er en korttidstest, i hvilken det nybefrugtede æg er udsat for giftstof indtil slutningen af blommesækstadiet. Der skal ikke fodres i denne test, og testen skal således afsluttes, medens yngelen stadig får sin næring fra blommesækken.

Testens formål er at finde letale og til en vis grad subletale virkninger af kemikalier på specielle stadier og arter. Denne test kunne skaffe nyttig viden, idet den kunne a) danne en bro mellem letale og subletale test, b) blive anvendt som en screeningtest enten for en test på alle tidlige livsstadier eller for en test for kronisk toksicitet og c) bruges til at teste arter, hvor dyrkningsteknikkerne ikke er tilstrækkeligt gode til at dække overgangsperioden mellem endogen og eksogen fodring.

Man bør erindre sig, at kun test, der omfatter alle stadier i fisks livscyklus, kan påregnes at give en præcis vurdering af kemikaliers kroniske toksicitet over for fisk, og at enhver begrænsning i påvirkning inden for livsstadierne kan reducere følsomheden og således undervurdere den kroniske toksicitet. Man må derfor forvente, at testen på fiske-embryoner og blommesækyngel har mindre følsomhed end en test, der omfatter alle tidlige livsstadier, specielt med hensyn til meget lipofile kemikalier (log $P_{ow}$ > 4) og til kemikalier med en særlig type toksisk virkning. Imidlertid må man forvente mindre forskelle i følsomhed mellem de to test med hensyn til kemikalier, der har en ikke-specifik, narkotisk virkningsmåde (1).

Forud for offentliggørelsen af denne test udført på fiskeembryoner og blommesækyngel havde man størst erfaring med anvendelsen af ferskvandsfisken Danio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae — almindeligt navn: zebrafisk). Mere detaljerede retningslinjer for resultater med denne art er derfor anført i tillæg 1. Dette udelukker ikke brugen af andre arter, for hvilke der ligeledes foreligger erfaringer (tabel 1A og 1B).

### 1.2. DEFINITIONER

**Laveste koncentration med statistisk sikkert observeret effekt (LOEC)** er den laveste kemikaliekoncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant virkning ($p < 0,05$), sammenlignet med kontrollen. Alle testkoncentrationer over LOEC skal forårsage skadelige virkninger på samme eller højere niveau end observeret ved LOEC.

**Koncentration uden statistisk sikkert observeret effekt (NOEC)** er testkoncentrationen lige under LOEC.

▼B

1.3. TESTPRINCIPPET

Fiskeembryoner og blommesækyngel udsættes for en række koncentrationer af testkemikaliet opløst i vand. Protokollen tillader valg mellem en semistatisk og en gennemstrømningsprocedure. Valget afhænger af testkemikaliets natur. Testen begynder med, at man anbringer befrugtede æg i forsøgsbeholderne, og den slutter, lige før blommesækken er blevet fuldstændig resorberet af en hvilken som helst af fiskelarverne i en hvilken som helst forsøgsbeholder, eller før dødsfald indtræffer i kontrolbeholderne på grund af sult. Letale og subletale virkninger måles og sammenlignes med kontrolværdierne for at fastslå den laveste koncentration med statistisk observeret effekt og ud derfra den koncentration, der ikke giver nogen statistisk sikker virkning. Alternativt kan man analysere resultaterne ved hjælp af en regressionsmodel for at finde frem til den koncentration, der ville give en bestemt procentisk effekt (dvs. $LC/EC_x$, hvor x er en defineret procentisk virkning).

1.4. KENDSKAB TIL TESTKEMIKALIET

Resultater fra en akut toksicitetstest (se metode C.1), fortrinsvis udført på arten valgt til denne test. bør foreligge. De kan være nyttige med henblik på valg af passende område af testkoncentrationer i testen udført på tidlige livsstadier. Vandopløselighed, (inklusive opløseligheden i testvandet) og testkemikaliets damptryk bør kendes. En pålidelig analyse til kvantificering af kemikaliet i testopløsningerne med kendt og publiceret »accuracy« og nederste målegrænse bør foreligge.

Informationer om testkemikaliet, nyttige for testbetingelserne, inkluderer strukturformel, renhedsgrad, lysstabilitet, stabilitet under testens betingelser, pKa, $P_{ow}$ og resultater fra en test for spontan biologisk nedbrydelighed (se metode C.4).

1.5. TESTENS VALIDITET

En tests validitet forudsætter:

— den generelle overlevelse af befrugtede æg i kontrollerne, og, hvor relevant, i kar med rent opløsningsmiddel skal være større end eller lig med grænserne definerede i tillæg 2 og 3

— koncentrationen af opløst ilt skal være mellem 60 og 100 % af værdien for mætning med luft (ASV) i hele testperioden

— vandtemperaturen må ikke variere mere end ± 1,5 °C imellem forsøgsbeholderne eller fra dag til dag på noget tidspunkt i testen, og den skal ligge i det temperaturområde, som gælder for den anvendte art. (tillæg 2 og 3).

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Forsøgsbeholdeme**

Enhver type glas eller andet inaktivt materiale kan anvendes. Forsøgsbeholdernes dimensioner skal være store nok til at klare kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) Det anbefales at anbringe forsøgsbeholdeme randomiseret. Et randomiseret design med grupper af forsøgsbeholdere, hvor samme behandling forefindes i hver gruppe, bør foretrækkes frem for et helt randomiseret system, når der er systematiske virkninger i laboratoriet, som kan kontrolleres ved gruppering. I den påfølgende dataanalyse bør der tages hensyn til en eventuel gruppering. Forsøgsbeholderne bør skånes for unødvendige forstyrrelser.

1.6.2. **Valg af fiskeart**

Anbefalede fiskearter ses i tabel 1A. Dette udelukker ikke anvendelsen af andre arter (eksempler ses i tabel 1B), men testproceduren må muligvis ændres for at opnå passende testbetingelser. Brug af andre arter og undersøgelsesmetode skal i så fald begrundes.

1.6.3. **Opbevaring af fisk til yngel**

Detaljer vedrørende pasning af fisk til yngel under tilfredsstillende omstændigheder kan findes i OECD TG 210 ([1]) og i henvisning (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4. **Håndtering af embryoner og fiskelarver**

Embryoner og fiskelarver kan, mens de udsættes for testkemikaliet, opholde sig i mindre kar med netvægge eller i rør med net for enderne med disse mindre kar placerede i forsøgskarret, således at testopløsningen kan flyde igennem. Man kan bevirke et ikke-turbulent flow gennem de mindre kar ved at lade dem hænge ned fra en arm, som bevæger karrene op og ned, dog altid med organismerne under overfladen; man kan også anvende et system med gennemskylning ved hjælp af overtryk. Befrugtede lakseæg kan anbringes på stativer eller net med masker tilstrækkeligt store til at lade larverne falde igennem efter udklækning. Pasteurpipetter er anvendelige til at flytte embryoner og larver i de semistatiske test i forbindelse med den daglige totale udskiftning af testopløsningen (se 1.6.6).

I de tilfælde, hvor man har anvendt beholdere, riste eller netværk til at holde æg inde i forøgskarret, skal disse fjernes, når æggene klækkes ([2]), idet man dog beholder det netværk, som hindrer fiskene i at forsvinde. Hvis det er nødvendigt at flytte fiskelarver, må de ikke udsættes for luft, og net bør ikke bruges til at fjerne fisk fra beholdere (fra en sådan advarsel kan nok undtages mindre sarte arter, som f.eks. karpen). Tidspunktet for en sådan overførsel varierer med arten og behøves ikke i alle tilfælde. Ved brug af den semistatiske teknik kan man anvende bægerglas eller lave beholdere, eventuelt, hvis nødvendigt, forsynet med et netværk løftet en smule op over bægerglassets bund. Hvis beholderne er store nok til at opfylde kravene til belastningsraten (se 1.7.1.2) kan overflytning af embryoner eller larver eventuelt undgås.

([1]) OECD. Paris, 1992, Test Guideline 210, »Fish, Early-life Stage Toxicity Test«.

([2]) Ifølge resultaterne af sådanne ringtest og en teknisk berigtigelse af ISO 6341 ligger $EC_{50}$ — 24 h for kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) mellem 0,6 mg/l og 1,7 mg/l.

▼B

1.6.5. **Vand**

Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 4 og i hvilket fiskearten i kontrolbeholderne har en overlevelse mindst lige så god som beskrevet i tillæg 2 og 3. Kvaliteten må ikke ændre sig i løbet af testperioden. pH skal holde sig inden for ± 0,5 pH-enheder. For at sikre, at vand til fortynding ikke får urimelig indflydelse på testresultaterne (f.eks. ved at danne kompleks med testkemikaliet) eller ved at indvirke uheldigt på de præstationer, man forventer af fisk til yngel, bør man regelmæssigt udtage prøver til analyse. Målinger af tungmetaller (f.eks. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), væsentlige kationer og anioner (f.eks. Ca, Mg, Na, K, Cl og $So_4$), pesticider (f.eks. totale organofosfor- og totale organochlorinopesticider), totalt organisk kulstof og opslæmmede faste stoffer bør f.eks. foretages hver tredje måned, hvis man ved, at fortyndingsvandet har en relativt konstant kvalitet. Hvis vandkvaliteten påviseligt har været konstant over mindst et år, kan analyserne foretages mindre hyppigt og med større intervaller (f.eks. hver sjette måned).

1.6.6. **Testopløsning**

Testopløsninger med den valgte koncentration fremstilles ved fortynding af en stamopløsning.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles ved opblanding eller oprystning af testkemikaliet i opløsningsvandet ad mekanisk vej (f.eks. omrøring og ultralydbehandling). Saturation colums (solubility columns) kan anvendes til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Videst muligt bør brugen af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler undgås; imidlertid kan den type stoffer være nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning. Som eksempler på anvendelige opløsningsmidler kan nævnes acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethyleneglycol. Som eksempel på en anvendelige dispergenser kan nævnes Cremophor RH40, Tween 80, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Stor omhu bør udvises, når man anvender stoffer, der er let biologisk nedbrydelige (f.eks. acetone) og/eller let fordampelige, da de kan medføre problemer med bakterielle belægninger i gennemstrømningstestene, Når et opløsningsmiddel anvendes, må det ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig uheldig virkning på de tidlige livsstadier, som det kan kontrolleres i en test med kun opløsningsmiddel. Alle anstrengelser bør imidlertid gøres for at undgå brugen af sådanne stoffer.

I den semistatiske teknik kan man følge to forskellige procedurer ved udskiftning af testopløsningen; enten i) fremstilles nye testopløsninger i rene forsøgsbeholdere og overlevende æg og larver flyttes forsigtigt inde i små volumina af den gamle opløsning til det nye forsøgsbeholdere, idet man undgår at udsætte dem for luft, eller ii) testorganismerne bibeholdes i forsøgsbeholderne, medens mindst tre fjerdedele af testvandet udskiftes. Hvor hyppigt det skal gøres, afhænger af testkemikaliets stabilitet, men en daglig udskiftning anbefales. Hvis tidligere stabilitetsforsøg (se 1.4) har vist, at testkemikaliets koncentration ikke er stabil (dvs. falder uden for 80-120 % af de nominelle grænser eller under 80 % af den målte begyndelseskoncentration) i løbet af udskiftningsperioden, bør man overveje at anvende en test med gennemstrømning. Under alle omstændigheder skal man være omhyggelig med ikke at stresse larverne, når vandet fornyes.

▼B

Til gennemstrømningstestene bruges et system, som kontinuerligt afmåler og fortynder en stamopløsning med test-kemikaliet (f.eks. peristaltpumper, *proportional diluter, saturator system*) for at yde en række forskellige koncentrationer til forsøgsbeholderne. Med mellemrum, fortrinsvis dagligt, kontrolleres flow-hastigheden fra stamopløsningen og vandfortyndingen, og de bør ikke variere mere end 10 % i testforløbet. En flow-hastighed svarende til volumenet af mindst fem målekamre pr. døgn er fundet passende (2).

1.7. FREMGANGSMÅDE

Nyttig viden om, hvad testen med fiskeembryoner og blommesækkyngel kan præstere, kan findes i litteraturen, og eksempler herpå kan findes i henvisning (7)(8)(9).

1.7.1. **Omstændigheder ved belastningen**

1.7.1.1. *Varighed*

Helst skal testen begynde mindre end 30 minutter efter befrugtningen. Embryonerne sænkes ned i testopløsningen før eller så snart som muligt efter at blastocysten har delt sig. og i hvert fald for begyndelsen af gastrula-stadiet. Med æg, der leveres udefra, kar. man ikke altid begynde testen umiddelbart efter befrugtningen. Da testens følsomhed kan blive alvorligt påvirket af en forsinket teststart, bør testen påbegyndes senest otte timer efter befrugtningen. Da fiskelarverne ikke fodres i testperioden, afsluttes testen, lige før blommesækken er resorberet fuldstændigt i en hvilken som helst larve i en hvilken som helst forsøgsbeholder, og før sultedøden indtræffer i kontrollerne. Varigheden afhænger af den anvendte art. Nogle anbefalede tider ses i tillæg 2 og 3.

1.7.1.2. *Belastning*

Antallet af befrugtede æg ved testens begyndelse skal kunne opfylde de statistiske krav. Æggene skal fordeles tilfældigt mellem de forskellige behandlinger og mindst 30 befrugtede æg, ligeligt fordelt, til mindst tre replikate testbeholdere pr. koncentration af testkemikalium (så vidt gørligt, det kan være vanskeligt med nogle arter at opnå lige store mængder). Belastningsraten (biomasse per volumen af testopløsningen) bør være så lav, så den opløste iltkoncentration på mindst 60 % ASV kan vedligeholdes uden beluftning. Til gennemstrømningstest anbefales en belastningsrate på ikke over 0,5 g/l per døgn og ikke over 5 g/l opløsning på noget tidspunkt (2).

1.7.1.3. *Lys og temperatur*

Perioderne med lys og testvandets temperatur skal passe til den valgte art (tillæg 2 og 3). For at holde temperaturen konstant kan det være nødvendigt med endnu et forsøgskar.

▼B

1.7.2. **Testkoncentrationer**

Normalt kræves fem koncentrationer af testkemikaliet med en afstandsfaktor, som ikke overstiger 3,2. Kurven fra de akutte toksicitetstest, som knytter $LC_{50}$ til testperioden, bør tages i betragtning, når man vælger området for testkoncentrationerne. Brug af færre end fem koncentrationer, for eksempel i en grænsetest, og et snævrere interval mellem koncentrationerne kan være rimeligt under nogle omstændigheder. Begrundelse skal anføres, hvis færre end fem koncentrationer anvendes. Det er ikke nødvendigt at teste koncentrationer højere end svarende til 96 timer $LC_{50}$ eller 100 mg/l, afhængigt af hvilken af disse, der er lavest. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger deres opløselighed i testvandet.

Når der anvendes et opløsningsmiddel som hjælp ved fremstillingen af testopløsninger (se 1.6,6), bør dets endelige koncentration i forsøgsbeholderen ikke overstige 0,1 ml/l og den skal være den samme i alle forsøgsbeholdere.

1.7.3. **Kontroller**

Sammen med testserien skal udføres en kontrol af fortyndingsvandet (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt) og ligeledes, hvis relevant, en kontrol, som indeholder opløsningsmiddel (replikate bestemmelser, hvis nødvendigt).

1.7.4. **Hyppighed af analyser og målinger**

I testperioden måles koncentrationen af testkemikaliet med regelmæssige mellemrum.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af testkemikaliet forventes at holdes inden for 20 % af det nominelle (dvs. inden for 80-120 %; se 1.4 og 1.6.6), anbefales det, som et minimum, at den højeste og laveste testkoncentration måles, når den er frisk fremstillet og umiddelbart før udskiftning ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over test-perioden (dvs. analyserne skal udføres på en prøve fra den samme opløsning, når den er frisk fremstillet og ved dens anvendelse ved udskiftning).

I test, hvor koncentrationen af testkemikaliet ikke forventes at holde sig inden for 20 % af den nominelle (baseret på kemikaliets stabilitetsdata), er det nødvendig; at analysere alle testkoncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning, efter samme system (dvs. ved mindst tre lejligheder jævnt fordelt over testperioden). Målingen af koncentrationen af testkemikaliet før udskiftning er kun nødvendigt på en af beholderne i replikate bestemmelser for hver testkoncentration. Målingerne skal foretages mindst hver uge. Det anbefales, at resultaterne baseres på målte koncentrationer. Hvis det imidlertid kan vises, at testkemikaliets koncentration testen igennem i tilstrækkelig grad har været holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration, kan resultaterne baseres på nominelle eller målte begyndelsesværdier.

Hvad angår gennemstrømningstest er det passende med et prøvetagningsregime som for de semistatiske test (men måling af udskiftede opløsninger er ikke mulig i disse tilfælde). Hvis imidlertid testen varer mere end en uge. er det tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger i den første uge (f.eks. til tre) for at sikre, at test-koncentrationcme holder sig stabile.

▼B

Det kan være nødvendigt at centrifugere eller filtrere (f.eks. med et filter med 0,45 μm porestørrelse). Da imidlertid hverken centrifugering eller filtrering altid synes at skille den biotilgængelige fra den ikke-biotilgængelige del af testkemikaliet, behøver prøver ikke at gennemgå disse behandlinger.

1 løbet af testen skal opløst ilt, pH og temperatur måles i alle testbeholderne. Hårdhedsgrad og saltindhold (hvis relevant) bør måles i kontrollerne og i en beholder med den højeste koncentration. Som et minimum skal opløst ilt og saltindhold (hvis relevant) måles tre gange (i begyndelsen, midt i og ved afslutningen af testen). I de semistatiske test anbefales det at måle ilt hyppigere, fortrinsvis før og efter hver vandudskiftning og mindst en gang om ugen. pH skal måles før og efter vandudskiftning i de semistatiske test og mindst en gang ugentlig i gennemstrømningstestene. I hver test skal hårdhedsgraden måles en gang. Temperaturen skal måles daglig og helst være monitoreret kontinuerligt i mindst en test-beholder.

1.7.5. **Observationer**

1.7.5.1. *Fosterets udviklingstrin*

Fosterstadiet (dvs. gastrula-stadiet) bør fastslås så sikkert som muligt ved testens begyndelse, hvor fosteret udsættes for testkemikaliet. Dette kan gøres ved undersøgelse af en repræsentativ samling æg, som på passende vis præpareres og godkendes. I litteraturen kan man finde beskrivelser og illustrationer af fosterstadier (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2. *Udklækning og overlevelse*

Udklækning og overlevelse observeres mindst en gang om dagen og noteres. I begyndelsen af testen kan det være ønskeligt at foretage hyppigere observationer (f.eks. hver halve time i løbet af de første tre timer), da overlevelsestid i nogle tilfælde kan være mere relevant end antallet af dødsfald alene (f.eks. når der er akutte toksiske virkninger). Døde embryoner og larver skal fjernes med det samme, eftersom de kan henfalde hurtigt. Meget stor omhu skal udvises, når døde individer fjernes, så nærtliggende æg eller larver ikke bliver ramt eller fysisk beskadigede, da de er meget sarte og følsomme. Kriterier for død varierer efter stadium:

— **for æg**: særligt i de tidlige stadier et tydeligt tab af gennemsigtighed og ændring i farve forårsaget af koagulation og/eller bundfældelse af proteiner, hvilket medfører en hvid uklarhed

— **for embryoner:** manglende bevægelighed og/eller hjerteslag og/eller uklar misfarvning i arter, hvor embryonerne almindeligvis er gennemskinnelige

— **for larver:** manglende bevægelighed og/eller manglende respirationsbevægelser og/eller manglende hjerteslag og/eller hvid uklar farvning af centralnervesystemet og/eller manglende reaktion på mekaniske stimuli.

▼B

1.7.5.3. *Abnormt udseende*

Antallet af larver, der udviser abnorm kropsform og/eller pigmentering, og tidspunkt for resorption af blommesækken skal noteres med passende mellemrum afhængigt af testens varighed og den beskrevne abnormitet. Det skal bemærkes, at abnorme embryoner og larver optræder almindeligt og kan opgøres til adskillige procent i kontrollerne hos visse arter. Abnorme dyr skal kun fjernes fra beholderne, når de er døde.

1.7.5.4. *Abnorm opførsel*

Abnorm opførsel, f.eks. hyperventilation, ukoordineret svømning og atypisk ubevægelighed, skal noteres med passende intervaller afhængigt af testens varighed. Disse virkninger kan, når de opdages, selvom de er vanskelige at kvantitere, hjælpe med til at tolke mortalitetsdata, dvs. skaffe viden om, hvorledes kemikaliets toksiske virkning udspiller sig.

1.7.5.5. *Længde*

Ved testens afslutning anbefales måling af individernes forskellige længde: Standard, fork eller totallængden kan anvendes. Hvis imidlertid der forekommer finneråd (svamp) ved halefinnen eller erosion af finner, anvendes standardlængden. Almindeligvis vil i en vellykket testvariationskoefficient for længden i replikate bestemmelser ligge på ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Vægt*

Ved testens afslutning kan foretages vejning af dyrene: Tørvægt (24 timer ved 60 °C) bør foretrækkes frem for vådvægt (aftørret). Almindeligvis vil i en vellykket test variationskoefficienten på vægten i replikate bestemmelser ligge på ≤ 20 %.

Disse observationer vil medføre, at nogle eller alle nedenstående data kan gøres til genstand for statistisk analyse:

— kumulativ mortalitet

— antal sunde larver ved afslutning af testen

— begyndelses- og sluttidspunkt for klækning (dvs. 90 % klækning i hvert replikat)

— det daglige antal larver, der klækkes

— længde (og vægt) af overlevende dyr ved testens afslutning

— antal larver, der er deforme eller har abnormt udseende

— antal larver, der opfører sig abnormt.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Det anbefales, at en statistiker involveres både i design og i analyse af testen, eftersom metoden tillader betragtelige variationer i tilrettelæggelse af eksperimentet, som f.eks. antallet af forsøgsbeholdere, antal testkoncentrationer, begyndelsesantal af befrugtede æg og de målte parametre. I betragtning af valgmulighederne i testdesign, vil her ikke blive vejledt i statistiske procedurer.

Hvis LOEC/NOECs skal beregnes, er det, for at beregne variationen inden for hvert sæt af replikater, nødvendigt at bruge variansanalyse (ANOVA) eller at anvende kontingenstabeller. Dunnets metode kan være nyttig til at foretage multiple sammenligninger mellem resultater fra individuelle koncentrationer og kontrollerne (12)(13). Andre nyttige eksempler kan også findes (14)(15). Størrelsen af den målbare effekt ved anvendelse af ANOVA eller andre procedurer (dvs. styrken af testen) bør udregnes og angives. Det bør bemærkes, at ikke alle observationer listet i 1.7.5.6 kan analyseres ved hjælp af ANOVA. F.eks. bør kumuleret død og antallet af sunde larver analyseres ved hjælp af probitmetoder.

Hvis LC/ECx'er skal beregnes, bør (en) passende kurve(r), f.eks. den logistiske kurve, fittes til de ønskede data ved hjælp af en statistisk metode som f.eks. mindste kvadraters metode eller ikke-lineære mindste kvadraters metode. Kurverne bør parametriseres, så den ønskede LC/ECx og dens standard error kan udregnes direkte. Dette vil gøre beregningen af sikkerhedsgrænserne for LC/ECx meget nemmere. Medmindre der er gode grunde til at foretrække andre sikkerhedsgrænser, bør tosidede 95 %-sikkerhedsgrænser angives. Fitningsmetoden skulle helst give mulighed for beregning af en signifikans for mangel på fit. Grafiske metoder for fitning af kurver kan anvendes. Regressionsanalyse kan anvendes på alle observationer listet i 1.7.5.6.

2.2. TOLKNING AF RESULTATER

Hvor den målte koncentration af giftstoffet i testopløsningen ligger nær analysemetodens detektionsgrænse, skal resultaterne tolkes med forsigtighed. Tolkning af resultater, hvor koncentrationerne ligger over stoffets vandopløselighed. skal også gøres med forsigtighed.

2.3. TESTRAPPORTEN

Testrapporten bør indeholde følgende information:

2.3.1. **Test-kemikaliet:**

— dets fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— kemiske identitets-data, heri renhedsgrad og, hvor nødvendigt, den analytiske metode til kvantificering af stoffet.

▼B

2.3.2. **Arten, anvendt i testen:**

— dens videnskabelige navn, herkomst, antal forældrefisk (dvs. hvor mange hundyr blev brugt for at fremskaffe det ønskede antal æg til testen), kilde og metode til indsamling af befrugtede æg og behandlingen af dem.

2.3.3. **Forsøgsbetingelser:**

— anvendt fremgangsmåde (f.eks.. semistatisk eller gennemstrømsforsøg, tidsforløb fra befrugtning til begyndelsen af testen, belastning osv.)

— lysperiode(r)

— testdesign (f.eks. antal forsøgsbeholdere og replikater, antal embryoner pr. replikat

— fremstillingsmetode til stamopløsning og hyppighed af udskiftning (hvis der er anvendt opløsningsmiddel, skal dets koncentration anføres)

— den nominelle testkoncentration, de målte værdier, gennemsnit og standarddeviationer for forsøgskarrene og metoden, hvorved de er opnået, og, hvis testkemikaliet er opløseligt i vand i koncentrationer, der ligger under de undersøgte, skal der skaffes bevis for, at målingerne refererer til testkemikaliet i opløsning

— karakteristik af fortyndningsvandet: pH, hårdhedsgrad, temperatur, koncentration af opløst ilt, niveau for residual-chlor (hvis målt), total organisk kulstof, opslæmmede substanser, saltindhold i testmediet (hvis målt) og enhver anden ting, som er målt

— vandkvalitet i forsøgskarrene: pH. hårdhedsgrad, temperatur og koncentration af opløst ilt.

2.3.4. **Resultater:**

— resultater fra ethvert præliminært forsøg med testkemikaliets stabilitet

— bevis på, at testdyrene gennemsnitligt har overlevet i kontrollerne svarende til den accepterede standard (tillæg 2 og 3)

— data vedrørende mortalitet/overlevelse på embryon- og larvestadierne og den totale mortalitet/overlevelse

— antal dage til klækningen og antal klækninger

— data vedrørende længde (og vægt)

— morfologiske abnormiteter beskrives, hvis de forekommer

— abnorm opførsel beskrives, hvis den forekommer

— statistisk analyse og behandling af data

— vedrørende test, hvor ANOVA er anvendt, anføres laveste observerede effekt-koncentration (LOEC) ved p = 0,05 og den koncentration, der var uden effekt (NOEC) ved hver måling, inklusive de statistiske procedurer og en angivelse af, hvilken størrelse effekt der kunne påvises

▼B

— i forbindelse med test, hvor regressionsteknik er anvendt, anføres LC/ECx og sikkerhedsgrænser og en graf med den fitningsmetode, der blev brugt til beregningen

— redegørelse for enhver afvigelse fra denne testmetode.

3. **HENVISNINGER**

(1) Kristensen P, (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn, J.L. and Schoettger, R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs, W.A. and Jones, B.R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale, H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.

(6) Legault, R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Bmchydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave, G., Damgaard, B., Grande, M., Martelin, J.E., Rosander, B. and Viktor, T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge, J.W., Black, J.A. and Westerman, A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen, C.J., Espeldoom, A. and Mol, F, (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout *{Salmo gairdneri),* J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129-145.

(10) Kirchen, R.V. and W.R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen, R.V. and W.R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.

(12) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(13) Dunnett, C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(14) Mc Clave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen, C.J., Adema, D.M.M. and Henries, J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, December 1992, 81 pp.

(17) Dave, G. and Xiu, R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21. pp. 126-134.

(18) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 25 2: pp. 231-236.

(19) Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F. and Roubaud, P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, pp. 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, *(Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve, G.M, Cooney, J.D., Mclntyre, D.O., Poccocic, T.L, Reichenbach, N.G., Dean, J.H. and Marcus, M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow *(Pimephales promelas)* larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, pp. 1189-1203.

(23) Calow, P, (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon, E. K. (198 5). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter, J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, in: W.S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

*Tabel 1A*

**Fiskearter, som er anbefalet til testning**

| Ferskvand |
|---|
| *Oncorhynchus mykiss* |
| Regnbueørred (9) (16) |
| *Danio rerio* |
| Zebrafisk (7) (17) (18) |
| *Cyprinus caprio* |
| Alm. karpe (8) (19) |
| *Oryzias latipes* |
| Japanese ricefish/Medaka (20) (21) |
| *Pimephales promelas* |
| Fathead minnow (8) (22) |

▼B

*Tabel 1B*

**Eksempler på andre veldokumenterede arter, som også har været anvendt**

| Ferskvand | Saltvand |
|---|---|
| *Carassius auralus*<br>Guldfisk (S) | *Menidia peninsulae*<br>Tidewater silverside (23) (24) (25) |
| *Lepomis macrochirus*<br>Bluegill (8) | *Clupea harengus*<br>Sild (24) (25) |
| | *Gadus morhua*<br>Torsk (24) (25) |
| | *Cyprinodon variegatus*<br>Sheepshead minnow (23) (24) (25) |

▼B

*Tillæg 1*

**VEJLEDNING I UDFØRELSE AF TOKSICITETSTEST PÅ EMBRYONER OG BLOMMESÆKYNGEL FRA ZEBRAFISK (BRACHYDANIO RERIO)**

INDLEDNING

Zebrafisken kommer oprindeligt fra Coromandelkysten i Indien, hvor den opholder sig i hurtigtrindende strømme. Den er en almindelig akvariefisk af karpefamilien, og oplysninger om fremgangsmåde i behandlingen og dyrkningen af den kan findes i standardreferenceværker om tropiske fisk. Dens biologi og anvendelse i fiskeriundersøgelser findes i et review af Laale (1).

Fisken bliver sjældent længere end 45 cm. Kroppen er cylindrisk med 7-9 mørkeblå horisontale striber. Disse striber løber ud i de caudale og anale finner. Ryggen er olivengrøn. Hannerne er slankere end hunnerne. Hunnerne er mere sølvskinnende, og abdomen er udspilet, særligt lige før æglægning.

Voksne fisk tåler store svingninger i temperatur, pH og vandhårdhed. For at sikre sig sunde fisk, som lægger æg af god kvalitet, bør man sørge for optimale betingelser.

Under æglægningen forfølger hannen hunnen og skubber til hende med snuden, og når æggene er kommet ud, bliver de befrugtede. Æggene, som er gennemsigtige og ikke-klæbende, synker til bunds, hvor de kan ædes af forældrene. Lys har indflydelse på æglægningen. Hvis lyset om morgenen er tilstrækkeligt, vil fiskene almindeligvis lægge æg i de tidlige timer efter morgengry.

En hun kan producere adskillige hundrede af æg ad gangen med ugers mellemrum.

FORÆLDREFISK, REPRODUKTION OG TIDLIGE LIVSSTADIER

Udvælg et passende antal sunde fisk og hold dem i passende vand (f.eks. tillæg 4) i mindst to uger før den ønskede æglægning. Fiskene bør formere sig mindst en gang, før de producerer den samling æg, der skal bruges i testen. Fisketætheden bør ikke overstige 1 gram fisk pr liter. Regelmæssig fornyelse af vand eller anvendelse af rensningsanlæg kan tillade større fisketæthed. Temperaturen i tankene bør holdes på 25 ± 2 ºC. Fiskene bør fodres med en varieret kost f.eks. af passende kommercielt tørfoder, levende nyklækkede Arthemia, chironomider, dafnier, hvide orm (Enchytraeider).

Nedenfor er skitseret to fremgangsmåder, der i praksis har ydet en tilstrækkelig mængde sunde, befrugtede æg til brug i en test:

i) 8 hunner og 16 hanner placeres i et akvarium med 50 liter fortyndingsvand, skærmet mod direkte lys og holdt så uforstyrret som muligt i mindst 48 timer. En bakke til ægopsamling anbringes i bunden af akvariet om eftermiddagen, dagen før testen begynder. Ægopsamlingsbakken består af en ramme (plexiglas eller andet passende materiale), 5-7 cm høj med et groft 2-5 mm net fæstnet til kanten og et 10-30 μm fint net på bunden. Et passende antal »æglægnings-træer«, lavet af optrevlet nylonreb, sættes fast på det grove net. Fiskene efterlades i mørke i 12 timer, hvorefter et svagt lys tændes, hvilket vil føre til æglægning. To til fire timer efter æglægningen fjernes bakken, og æggene samles. Bakken vil hindre fiskene i at æde æggene og letter samtidig indsamlingen af æggene. Disse fisk skal have lagt æg mindst en gang før den, hvorfra æggene anvendes til testning.

▼B

ii) Fra 5 til 10 han- og hunfisk holdes adskilt hver for sig i mindst to uger før den planlagte æglægning. Efter 5-10 dage vil hunnernes abdomen være udspilet og deres papillae genitales synlige. Sådanne har hanfisk ikke. Æglægning foregår i et æglægningsakvarium, forsynet med en falsk netværksbund (som ovenfor). Akvariet fyldes med fortyndingsvand, så der står 5-10 cm vand over nettet. En hun og to hanner anbringes i akvariet dagen før den planlagte æglægning. Vandtemperaturen øges gradvist til en grad over akklimatisationstemperaturen. Lyset slukkes, og akvariet holdes så uforstyrret som muligt. Næste morgen tændes et svagt lys, som får æglægningen til at gå i gang. 2-4 timer efter fjernes fiskene, og æggene indsamles. Hvis man har brug for flere æg, end en enkelt hun kan levere, opstilles flere akvarier parallelt. Ved at notere sig formeringens størrelse og kvalitet for hver hun før testen, kan man udvælge sig de bedste hunner til formering.

Æggene flyttes til forsøgsakvariet ved hjælp af glasrør med en indre diameter ikke mindre end 4 mm og forsynede med en sugeballon. Mængden af vand, der flyttes med æggene ved flytningen, skal være så ringe som muligt. Æggene er tungere end vand og synker selv ud af røret. Omhu skal udvises, så æg (og larver) ikke kommer i kontakt med luften. Ved hjælp af mikroskopiske undersøgelser af prøver fra æggene sikrer man sig, at de første stadier ikke udviser irregulære former. Det er ikke tilladt at desinficere æggene.

Mortaliteten blandt æggene er størst inden for de første 24 timer efter befrugtningen. Ofte ses en mortalitet på 5-40 %. Æg degenerer på grund af befrugtning, der ikke lykkes, eller udviklingsfejl. Æggenes kvalitet synes at bero på hunfisken, da nogle hunner hele tiden producerer gode ægkvaliteter, mens andre aldrig gør det. Udviklingshastigheden og klækningshastigheden varierer fra et kuld til et andet. Hvor befrugtningen lykkes, og hvor blommesækynglen klarer sig godt, overlever normalt over 90 %. Ved 25 ºC klækkes æggene 3-5 dage efter befrugtningen, og blommesækken resorberes ca. 13 dage efter befrugtningen.

Fosterudviklingen er vel beskrevet af Hisaoka og Battle (2). På grund af æggenes og de udklækkede larvers gennemsigtighed kan fiskenes udvikling følges, og tilstedeværelsen af malformationer observeres. Omkring 4 timer efter æglægningen kan de ikke-befrugtede æg skelnes fra de befrugtede (3). Til denne undersøgelse bliver æg og larver anbragt i små undersøgelseskar og set på under mikroskop.

Testbetingelserne, som vedrører de tidlige livsstadier, findes i tillæg 2. De optimale værdier for pH og vandhårdhed er 7,8 og 250 mg $CaCO_3$/l, respektive.

BEREGNINGER OG STATISTIK

Der foreslås beregninger i to tempi. Først foretages statistisk analyse af data vedrørende mortalitet, unormal udvikling og klækningstidspunkt. Derefter evalueres kropslængden statistisk for de koncentrationer, hvor ingen af ovennævnte negative virkninger kunne ses. Denne fremgangsmåde tilrådes, eftersom giftstoffet kan tænkes selektivt at dræbe mindre fisk, forsinke klækningstidspunktet og forårsage grove malformationer og på den måde føre til længdemålinger med bias. Ydermere vil der være stort set samme antal fisk at måle pr. undersøgelse, hvilket sikrer teststatistikkens validitet.

▼B

$LC_{50}$ OG $EC_{50}$-BESTEMMELSER

Procentdelen af overlevende æg og larver beregnes og korrigeres for mortalitet i kontrollerne efter Abbotts formel (4):

$$P = 100 - \left( \frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

hvor

P = korrigeret % overlevelse

P' = % observeret overlevelse i testkoncentrationen

C = % overlevelse i kontrollen

Hvis man ønsker at inkludere morfologiske abnormiteter i $EC_{50}$-statistikken, kan man finde vejledning i Stephan (5).

ESTIMERING AF LOEC OG NOEC

Et af formålene med æg og blommesækyngelstestene er at sammenligne koncentrationerne over nul med kontrolgruppens, dvs. at bestemme LOEC. Derfor bør multiple sammenligningsprocedurer anvendes (6)(7)(8)(9)(10).

HENVISNINGER

(1) Laale, H.W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio raid)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, pp. 121-173.

(2) Hisaoka, K.K. and Battle, H.I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 pp.

(3) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabårbling *(Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, pp. 173-181.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.

(5) Stephan, C.E. (198 2). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard ssessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett, C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(7) Dunnett, C.W, (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams, D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams, D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

*Tillæg 2*

**TESTBETINGELSER, VARIGHED OG OVERLEVELSESKRITERIER FOR DE ANBEFALEDE ARTER**

| Art | Temperatur ($^0$C) | Saltindhold (0/00) | Lysperiode (timer) | Varighed af stadier (dage) | | Typisk testvarighed | Overlevelseskontrol (minimum %) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embryoner | Blommesæ-kyngel | | Klækningssucces | Efter klækning |
| FERSKVAND | | | | | | | | |
| *Brachydanio rerio*<br>Zebrafisk | 25 ± 1 | — | 12-16 | 3-5 | 8-10 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (8-10 dage) | 80 | 90 |
| *Oncorhynchus mykiss*<br>Regnbueørred | 10 ± 1 ([1])<br>12 ± 1 ([2]) | — | 0 ([3]) | 30-35 | 25-30 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 20 dage efter klækning (50-5 5 dage) | 66 | 70 |
| *Cyprinus carpio*<br>Alm. karpe | 21-25 | — | 12-16 | 5 | > 4 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage) | 80 | 75 |
| *Oryzias latipes*<br>Japanese ricefish/Medaka | 24 ± 1 ([1])<br>23 ± 1 ([2]) | — | 12-16 | 8-11 | 4-8 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastruia-sta-dium) til 5 dage efter klækning (13-16 dage) | 80 | 80 |
| *Pimephales promelas*<br>Fathead minnow | 25 ± 2 | — | 16 | 4-5 | 5 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-sta-dium) til 4 dage efter klækning (8-9 dage) | 60 | 70 |

([1]) Gældende embryoner.
([2]) Gældende for larver.
([3]) Mørke for embryoner og larver op til en uge efter klækning, undtagen ved inspektion. Siden svagt lys i resten af testen.

▼B

*TILLÆG 3*

**Veldokumenterede testbetingelser, varighed og overlevelseskriterier for andre brugbare arter**

| Art | Temperatur ( °C) | Saltindhold (0/00) | Lysperiode (timer) | Varighed af stadier (dage) | | Typisk testvarighed for embryoner og blommesæ-kyngel | Overlevelse kontrol (minimum %) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embryoner | Blommesæ-kyngel | | Klækningssucces | Efter klækning |
| FERSKVAND | | | | | | | | |
| *Carassius auratus*<br>Guldfisk | 24 ± 1 | — | — | 3-4 | > 4 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage) | — | 80 |
| *Leopomis macrochirus*<br>Blugill sunfish | 21 ± 1 | — | 16 | 3 | > 4 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 4 dage efter klækning (7 dage) | — | 75 |
| SALTVAND | | | | | | | | |
| *Menidia peninsulae*<br>Tidewater silverside | 22-25 | 15-22 | 12 | 1,5 | 10 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 5 dage efter klækning (6-7 dage) | 80 | 60 |
| *Clupea harengus*<br>Sild | 10 ± 1 | 8-15 | 12 | 20-25 | 3-5 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (23-27 dage) | 60 | 80 |
| *Gadus morhua*<br>Torsk | 5 ± 1 | 5-30 | 12 | 14-16 | 3-5 | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-stadium) til 3 dage efter klækning (18 dage) | 60 | 80 |
| *Cyprinodon variegatus*<br>Sheepshead minnow | 25 ± 1 | 15-30 | 12 | — | — | Så hurtigt som muligt efter befrugtning (tidl. gastrula-sta-dium) til 4-7 dage efter klækning (28 dage) | > 75 | 80 |

▼B

*TILLÆG 4*

**NOGLE KEMISKE KARAKTERISTIKA FOR ACCEPTABELT FORTYNDINGSVAND**

| Substans | Koncentration |
|---|---|
| Faste stoffer | < 20 mg/l |
| Totalt organisk kulstof | < 2 mg/l |
| Ikke-ioniseret ammonium | < 1 µg/l |
| Residualt chlor | < 10 µg/l |
| Total organophosphor-pesticider | < 50 ng/l |
| Total organochlorino-pesticider + polychlor-biphenyler | < 50 ng/l |
| Total organisk chlor | < 25 ng/l |

▼B

C.16. **HONNINGBIER — AKUT ORAL TOKSICITETSTEST**

1. **METODE**

Denne korttids toksicitetstestmetode svarer til OECD TG 213 (1998).

1.1. INDLEDNING

Denne toksicitetstest er en laboratoriemetode beregnet til at fastlægge den orale akutte toksicitet af plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier på voksne arbejdsbier.

I forbindelse med fastlæggelse og evaluering af stoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at fastslå den akutte orale toksicitet over for honningbier, f.eks. når det er sandsynligt, at bier bliver udsat for stoffet. Den akutte orale toksicitetstest udføres for at fastslå den iboende toksicitet af pesticider og andre kemikalier over for bier. Resultaterne af testen bør anvendes for at fastslå en eventuel nødvendighed af yderligere undersøgelser. Særligt kan metoden anvendes i programmer med henblik på at vurdere de risici, pesticider udgør for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitetstest til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg (l). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og testprocedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

**Akut oral toksicitet:** er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en oral indtagelse af en enkelt dosis af testkemikaliet.

**Dosis:** er den mængde af test-kemikaliet, som er indtaget. Dosis udtrykkes som masse (mg) af testkemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde testkemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

**$LD_{50}$ (Mediane letale dosis) oral:** er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, indtaget oralt. $LD_{50}$-værdien udtrykkes i mg testkemikalium pr. bi. Hvad pesticider angår, kan testkemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

**Mortalitet:** et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en række doser af testkemikaliet i en rørsukkeropløsning. Derefter får bierne samme føde, men uden testkemikaliet. Mortaliteten noteres daglig i mindst 48 timer og sammenlignes med kontrolværdierne. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. ≤ 10 %, bør man forlænge testperioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne $LD_{50}$ ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

▼B

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— $LD_{50}$ for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Indsamling af bier**

Unge. voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles om morgenen eller om aftenen før brugen og holdes under testbetingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitetsundersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. **Opbevaring og fodringsbetingelser**

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Det er bedst med ti bier pr bur. Størrelsen af testburene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være for tilstrækkelig plads.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % w/v). Efter at testdosis er givet, forsynes bierne med føde ad libitum. Fordringssystemet bør tillade registrering af fødeindtagelse for hvert bur (se 1.6.3.1). Et glasrør, ca. 50 mm langt med 10 mm lysning, med den åbne ende indsnævret til 2 mm, kan anvendes.

1.5.3. **Forberedelse af bierne**

De indsamlede bier fordeles tilfældigt i burene, som placeres tilfældigt i forsøgsrummet.

▼B

Bierne må sulte op til to timer før forsøgets begyndelse. Det anbefales, at bierne sulter før behandlingen, så at alle bier står lige med hensyn til tarmindhold ved forsøgets begyndelse. Moribunde bier skal kasseres og erstattes med sunde bier, før forsøget indledes.

1.5.4. **Fremstilling af doser**

Hvor testkemikaliet er kan blandes i vand. kan det dispenseres direkte i en 50 % rørsukkeropløsning. Der kan i forbindelse med tekniske produkter og stoffer med lav vandopløselighed anvendes hjælpestoffer såsom organiske opløsningsmidler, blødgøringsmidler eller dispergenser med lav toksicitet over for bier (f.eks. acetone, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Hjælpestoffets koncentration afhænger af teststoffets opløselighed og bør være den samme i alle koncentrationer, der undersøges. Imidlertid er en koncentration af hjælpestoffet på 1 % normalt passende og bør ikke overskrides.

Tilsvarende kontroloplø sninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre test-kemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper: en til opløsning i vand og en til rørsukkeropløsning med opløsningsmiddel/hjælpestof med samme koncentration som i forsøgsopløsningerne.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Test- og kontrolgrupper**

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af $LD_{50}$ med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for $LD_{50}$. Fortyndingsfaktor og antal dosiskoncentrationer bør imidlertid beregnes ud fra toksicitetskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosisområdet kan være til hjælp for fastlæggelse af dosiskoncentrationerne.

Mindst tre testgrupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver testkoncentration. Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med testserien. Kontrolgrupper skal også inkluderes til belysning af de opløsningsmidler og hjælpestoffer, der anvendes (se 1.5.4).

1.6.2. **Toksisk standard**

En toksisk standard (dvs. et kendt toksisk stof) skal inkluderes i testserien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede $LD_{50}$-værdi. Mindst tre bure. hver med ti bier. skal udsættes for hver testdosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoat, for hvilket det angives, at den orale $LD_{50}$-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,35 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (f.eks. parathion).

▼B

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Hver test-gruppe bier skal forsynes med 100-200 ml 50 % vandig rørsukkeropløsning, indeholdende testkemikaliet i den rigtige koncentration. Større volumen kræves til kemikalier, der er tungt opløselige, har lav toksicitet eller lav koncentration i præparatet, da der skal bruges større mængder i rørsukkeropløsningen. Mængden af behandlet føde, der indtages, skal monitoreres. Når den er indtaget (almindeligvis efter 3-4 timer), skal fodringssystemet fjernes fra buret og udskiftes med et nyt, som kun indeholder rørsukkeropløsning, og som tilføres ad libitum. Nogle stoffer kan i højere doser medføre, at der indtages kun lidt eller ingen føde. Efter højst 6 timer skal resten af den behandlede føde fjernes og erstattes med ren rørsukkeropløsning. Mængden af behandlet føde, der er indtaget, skal beregnes (f.eks. via måling af volumen/vægt af resterende behandlet føde).

1.6.3.2. *Varighed*

Testen varer fortrinsvis til 48 timer efter at testopløsningen er blevet erstattet med ren rørsukkeropløsning. Hvis mortaliteten fortsætter med at stige med mere end 10 % efter de første 24 timer, bør testvarigheden udvides til maksimalt 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4 timer efter testens start og derefter 24 og 48 timer efter (dvs. efter givet dosis). Hvis en længere observationsperiode er nødvendig, registreres yderligere hver 24. time op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontroldyrene ikke overstiger 10 %.

Den mængde føde, der indtages af hver gruppe, skal vurderes. Sammenligning af den hastighed, hvormed den behandlede og den ikke behandlede føde indtages inden for 6 timer, kan skaffe viden om den behandlede fødes smagskvalitet.

Enhver unormal opførsel observeret blandt bierne i forsøgsperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænsetest**

I visse tilfælde (f.eks. hvis et testkemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænsetest, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at $LD_{50}$ er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate testgrupper til testdosis, de relevante kontroller, vurderingen af indtaget behandlet føde og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se 1.6.4), skal de registreres.

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (f.eks. probitanalyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4), Plot dosisresponskurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, $LD_{50}$ med 95 % sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.h.a. Abbotts korrektion (4) (5). Hvis den behandlede føde ikke er totalt indtaget, skal dosis af testkemikalium indtaget pr. gruppe bestemmes. $LD_{50}$ skal udtrykkes som mg testkemikalium pr. bi.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Test-kemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kermske egenskaber (f.eks. stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive strukturformel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Testdyr**

— videnskabeligt navn, race, omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af testbier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

2.2.3. **Testomstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved fremstilling af stamopløsning og testopløsning (eventuelt opløsningsmiddel og dets koncentration skal angives)

— testdesign, dvs. antal testkoncentrationer og deres størrelse, antal kontroller; for hver testkoncentration og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

▼B

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrationsområder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosisresponskurve ved forsøgets slutning

— $LD_{50}$-værdier med 95 %-sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for testkemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af $LD_{50}$

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter oberverede eller målte, f.eks. abnorm opførsel blandt bierne (inklusive manglende indtagelse af testdosis), konsumptionshastighed både hvad angår den behandlede og den ubehandlede gruppe

— enhver fravigelse af testfremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **HENVISNINGER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1. pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol, 18, pp. 265-267.

▼B

C.17. **HONNINGBIER — AKUT KONTAKTTOKSICITETSTEST**

1. **METHODE**

Denne akut toksicitets-testmetode svarer til OECD TG 214 (1998).

1.1. INDLEDNING

Denne toksicitetstestmetode er en laboratoriemetode, beregnet til at vurdere den akutte toksicitet over for voksne arbejdshonningbier ved kontakt med plantebeskyttelsesmidler og andre kemikalier.

Ved vurderingen og evalueringen af kemikaliers toksiske karakteristika kan det være ønskværdigt at bestemme den akutte kontakttoksicitet over for honningbier, f.eks. når det er sandsynligt, at bier kan blive udsat for de pågældende kemikalier. Den akutte toksicitetstest udføres for at bestemme pesticiders og andre kemikaliers naturlige toksicitet over for bier. Resultaterne af denne test er tænkt anvendt til at fastslå behovet for yderligere evaluering. Specielt kan metoden bruges i programmer, der evaluerer den fare, som pesticider betyder for bier, baseret på en trinvis progression fra laboratorietoksicitetstest til tilnærmede feltforsøg og rene feltforsøg (1). Pesticider kan testes som aktive substanser (a.s.) eller som færdiggjorte produkter.

En toksisk standard bør medtages til at fastslå biernes følsomhed og testprocedurens præcision.

1.2. DEFINITIONER

**Akut kontakt toksicitet:** er den skadelige effekt, som indtræffer inden for maksimum 96 timer efter en lokal applikation af en enkelt dosis af et kemikalium.

**Dosis:** er den mængde af test-kemikaliet, som er påført. Dosis udtrykkes som masse (mg) af testkemikalium per test-dyr (mg/bi). Den reelle dosis, som hver bi får, kan ikke beregnes, da bierne fodres kollektivt, men en gennemsnitlig dosis kan skønnes (den totale mængde test-kemikalium indtaget/antal test-bier i et bur).

**$LD_{50}$ (Mediane letale dosis) kontakt:** er en statistisk beregnet enkeltdosis af et kemikalium, der kan forårsage død af 50 % af dyrene, når det administreres via kontakt. $LD_{50}$-værdien udtrykkes i mg testkemikalium pr. bi. Hvad pesticider angår, kan testkemikaliet være enten en aktiv substans (a.s.) eller et færdiggjort produkt, indeholdende et eller flere aktive kemikalier.

**Mortalitet**: et dyr regnes for dødt, når det er totalt immobilt.

1.3. TESTMETODENS PRINCIP

Voksne arbejdshonningbier (Apis mellifera) udsættes for en serie forskellige doser af testkemikaliet, opløst i et passende medie, gennem en direkte applikation på thorax (små dråber). Forsøget varer 48 timer. Hvis mortaliteten øges mellem 24 og 48 timer, mens kontrolværdierne holder sig på det accepterede niveau, dvs. < 10 %, bør man forlænge testperioden til de maksimale 96 timer. Resultaterne analyseres for at beregne $LD_{50}$ ved 24 timer og 48 timer og, hvis forsøget forlænges, ved 72 og 96 timer.

▼B

1.4. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, gælder

— at den gennemsnitlige mortalitet for alle kontroller skal være 10 % eller mindre ved forsøgets afslutning

— $LD_{50}$ for den toksiske standard falder inden for det forventede.

1.5. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.5.1. **Indsamling af bier**

Unge, voksne bier af samme race bør anvendes, dvs. bier på samme alder, i samme foderstand, race osv. Bierne hentes fra tilstrækkeligt fodrede, sunde, så vidt muligt sygdomsfri kolonier, som er dronningret. Deres fortid og fysiologiske status bør kendes. De kan indsamles aftenen for brugen og holdes under testbetingelserne til næste dag. Bier fra rammer uden yngel kan anvendes. Indsamling i det tidlige forår eller sene efterår bør undgås, da bierne har ændret fysiologi på den tid. Hvis testen skal udføres i det tidlige forår eller sene efterår, kan bierne holdes i en inkubator i en uge og fodres med »bi-brød« (pollen indsamlet fra vokskagen) og rørsukkeropløsning. Bier, der har været behandlet med kemiske stoffer, såsom antibiotika, anti-varroaprodukter osv., bør ikke bruges til toksicitetsundersøgelser før fire uger efter slutningen af behandlingen.

1.5.2. **Opbevaring og fodringsbetingelser**

Der anvendes bure, der er rene og godt ventilerede. Alt passende materiale kan anvendes, såsom rustfrit stål, metalnet, plastik eller engangstræbure, osv. Størrelsen af testburene skal passe til antallet af bier, dvs. der skal være tilstrækkelig plads. Det er bedst med ti bier pr. bur.

Bierne holdes i mørke i forsøgsrummet ved en temperatur på 25 ± 2 °C. Den relative fugtighed, normalt omkring 50-70 %, skal registreres under hele forsøget. Håndtering, inklusive behandling og observation kan forgå ved (dags)lys. Som føde anvendes vandig rørsukkeropløsning med en slutkoncentration på 500 g/l (50 % w/v) og tilbydes ad libitum under forsøget, idet man anvender et fodringssystem, der kan være et glasrør (ca. 50 mm langt og med en lysning på 10 mm og med den åbne ende indsnævret til 2 mm i diameter).

1.5.3. **Forberedelse af bierne**

De indsamlede bier kan bedøves med carbondioxid eller nitrogen, når testkemikaliet skal appliceres. Mængden af anæstetikum og bedøvelsestiden bør være mindst mulig. Moribunde bier skal kasseres og erstattes af sunde bier, før testen påbegyndes.

1.5.4. **Fremstilling af doser**

Testkemikaliet skal appliceres som en opløsning i et medium, dvs. et organisk opløsningsmiddel eller en vandig opløsning med overfladeaktive stoffer. Som organisk opløsningsmiddel foretrækkes acetone, men andre organiske opløsningsmidler med lav toksicitet over for bier kan bruges (f.eks. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Vandopløselige færdiggjorte produkter og højpolære organiske substanser, som ikke er opløselige i organiske opløsningsmidler, kan være lettere at påføre, hvis de tilberedes i en svag opløsning af kommercielle overfladeaktive stoffer (f.eks.. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Tilsvarende kontroloplø sninger bør fremstilles, dvs. hvor opløsningsmiddel eller dispergens bliver anvendt til at gøre testkemikaliet opløseligt, bør der anvendes to adskilte kontrolgrupper, en behandlet med vand og en med opløsningsmiddel/dispergent.

1.6. FREMGANGSMÅDE

1.6.1. **Test- og kontrolgrupper**

Antallet af doser og replikater bør svare til de statistiske krav for bestemmelse af $LD_{50}$med 95 % sikkerhedsgrænser. Normalt kræves dertil fem doser i en geometrisk serie med en faktor, der ikke overstiger 2,2, og som dækker området for $LD_{50}$. Antallet af doser bør imidlertid beregnes ud fra toksiciteteskurvens hældning (dosis over for mortalitet), idet man tager hensyn til den statistiske metode, hvormed man har valgt til at analysere resultaterne. En test til fastlæggelse af dosisområdet kan være til hjælp for fastlæggelse af dosiskoncentrationerne.

Mindst tre testgrupper, hver på ti bier, bør udsættes for hver testkoncentration.

Mindst tre kontrolgrupper, hver på ti bier, deltager parallelt med testserien. Hvis der er anvendt et organisk opløsningsmiddel eller et overfladeaktivt stof, skal der inkluderes yderligere tre kontrolgrupper på ti bier hver for opløsningsmidlet eller det overfladeaktive stof.

1.6.2. **Toksisk standard**

En toksisk standard skal inkluderes i testserien. Af den bør udvælges mindst tre doser for at dække den forventede $LD_{50}$-værdi. Mindst tre bure, hver med ti bier, skal udsættes for hver testdosis. Den foretrukne toksiske standard er dimethoat, for hvilket det angives, at kontakt-$LD_{50}$-24 timer befinder sig i størrelsesordenen 0,10-0,30 mg aktive substanser/bi (2). Andre toksiske standarder kan naturligvis anvendes, hvis tilstrækkelige data kan fremskaffes til belysning af forventet dosis-respons (f.eks. parathion).

1.6.3. **Belastning**

1.6.3.1. *Administration af doser*

Bedøvede bier behandles individuelt med lokal applikation. Bierne randomiseres til de forskellige testdoser og kontroller. 1 ml af opløsningen, der indeholder testkemikaliet i den passende koncentration, anbringes med en mikroapplikator på dorsalsiden af thorax af bien. Andre volumina kan anvendes, hvis der er grund til det. Efter applikationen anbringes bierne i testburene og forsynes med rørsukkeropløsning.

1.6.3.2. *Varighed*

Forsøgets varighed er almindeligvis 48 timer. Hvis mortaliteten øger mere end 10 % mellem 24 og 48 timer, skal forsøgsvarigheden forøges til op til 96 timer, under forudsætning af, at mortaliteten blandt kontrollerne ikke overstiger 10 %.

▼B

1.6.4. **Observationer**

Mortaliteten registreres 4, 24 og 48 timer efter applikationen. Hvis det er nødvendigt med en forlænget observationsperiode, skal observationerne foretages med 24-timers intervaller, op til 96 timer, under forudsætning af, at kontrolmortaliteten ikke overstiger 10 %.

Enhver unormal opførsel som observeres i testperioden skal registreres.

1.6.5. **Grænsetest**

I visse tilfælde (f.eks. hvis et testkemikalium forventes at besidde lav toksicitet) kan man udføre en grænsetest, hvor man anvender 100 mg aktiv substans/bi, for at vise, at $LD_{50}$ er større end denne værdi. Samme fremgangsmåde skal anvendes, inklusive tre replikate testgrupper til testdosis, de relevante kontroller og brugen af toksisk standard. Hvis dødsfald indtræder, skal der udføres et komplet forsøg. Hvis subletale virkninger observeres (se 1.6.4), skal de rapporteres.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. DATA

Data skal opsummeres i tabelform, der viser, for hver behandlet gruppe, kontrolgrupper og grupper med toksisk standard, antallet af anvendte bier, mortaliteten for hvert observationstidspunkt og bier med usædvanlig opførsel. Analyser mortaliteten ved hjælp af passende statistiske metoder (f.eks. probitanalyser, vægtede gennemsnit, binominal sandsynlighed) (3)(4). Plot dosisresponskurver for hver tidspunkt, hvor observationer anbefales, (dvs. efter 24, 48 og, hvis relevant. 72 og 96 timer) og beregn kurvehældninger og den mediane letale dosis, $LD_{50}$, med 95 %-sikkerhedsgrænser. Korrektioner for kontrolleret mortalitet kan foretages v.h.a. Abbotts korrektion (4)(5). $LD_{50}$ skal udtrykkes som mg testkemikalium pr. bi.

2.2. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende informationer:

2.2.1. **Testkemikalium:**

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (f.eks. stabilitet i vand, damptryk)

— data for kemisk identifikation, inklusive struktur-formel, renhedsgrad (dvs. for pesticider: identitet og koncentration af aktive substans(er)).

2.2.2. **Testdyr**

— videnskabeligt navn. race. omtrentlige alder (i uger), indsamlingsmetode, dato for indsamling

— informationer om kolonier, der er anvendt til indsamlingen af testbier, inklusive sundhed, voksensygdomme, tidligere behandling osv.

▼B

2.2.3. **Testomstændigheder**

— temperatur og forsøgsrummets relative fugtighedsgrad

— opbevaringsbetingelser, inklusive burets type, størrelse og materiale

— fremgangsmåde ved administration af testkemikalium (det anvendte opløsningsmedium, volumen af testopløsning, det anvendte anæstetikum

— testdesign, f.eks. antal og størrelse af testdoser, antal kontroller; for hver testdosis og kontrol angives antal replikater og antal bier pr. bur

— dato for testen.

2.2.4. **Resultater:**

— resultater af eventuelle forsøg med koncentrationsområder

— rådata: mortaliteten for hver koncentration ved hvert observationstidspunkt

— graf af dosisresponskurve ved forsøgets slutning

— $LD_{50}$-værdier med 95 %-sikkerhedsgrænser for hvert anbefalet observationstidspunkt, for testkemikalium og toksisk standard

— statistisk procedure for fastlæggelse af $LD_{50}$

— mortaliteten blandt kontroldyrene

— andre biologiske effekter, observerede eller målte, og abnorm opførsel blandt bierne

— enhver fravigelse af testfremgangsmåden, som her er beskrevet, samt enhver anden relevant oplysning.

3. **HENVISNINGER**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.l, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

▼B

## C.18. ADSORPTION/DESORPTION MED EN BATCH-LIGEVÆGTSMETODE

### 1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 106: »Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equili-brium Method« (2000).

### 1.1. INDLEDNING

I metoden er taget hensyn til en ringtest og en workshop om udvælgelse af jord med henblik på udvikling af en adsorptionstest (1) (2) (3) (4) samt eksisterende guidelines på nationalt plan (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Adsorptions-/desorptionsundersøgelser kan skaffe vigtige oplysninger om kemiske stoffers mobilitet og fordeling i biosfærens jord-, vand- og luftcompartments (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Sådanne oplysninger kan anvendes til opstilling af prognoser eller overslagsberegninger f.eks. vedrørende muligheden for kemisk nedbrydning (22) (23), omdannelse og optagelse i organismer (24), udvaskning gennem jordbundsprofilen (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), fordampning fra jorden (21) (29) (30) og afstrømning fra jordoverfladen til naturlige vande (18) (31) (32). Adsorptionsdata kan anvendes til at drage sammenligninger og opstille modeller (19) (33) (34) (35).

Et kemisk stofs fordeling mellem jord- og vandfase er en kompleks proces, som bestemmes af en række forskellige faktorer: stoffets kemiske egenskaber (12) (36) (37) (38) (39) (40), jordens karakteristika (4) (12) (13), (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) samt klimatiske faktorer som nedbør, temperatur, sollys og vind. De mange fænomener og mekanismer, som medvirker ved adsorption af et kemisk stof til jord, kan således ikke fastlægges fuldt ud ved en forenklet laboratoriemodel som nærværende metode. Men uanset at denne tentativt opstillede metode ikke kan dække alle tilfælde, der kan forekomme i miljøet, giver den tilstrækkelige oplysninger om den miljømæssige relevans af adsorptionen af et kemisk stof.

Se også den generelle indledning.

### 1.2. OMRÅDE

Metodens formål er at gøre det muligt at foretage en skønsmæssig beregning af et stofs adsorption/desorption i jord. Målet er at nå frem til en sorptionsværdi, med hvilken fordelingen under forskellige miljøforhold kan forudsiges; til dette formål bestemmes ligevægts-adsorptionskoefficienter for et kemisk stof på forskellige jordtyper som funktion af jordens egenskaber (f.eks. dens indhold af organisk kulstof, lerindholdet samt jordens struktur og pH). Det er nødvendigt at anvende forskellige jordtyper for at få så bred dækning som muligt af vekselvirkningen mellem et givet stof og naturligt forekommende jordtyper.

I denne metode forstås ved adsorption den proces, hvorved et kemisk stof bindes til overfladen af forskellige jordtyper; der skelnes her ikke mellem forskellige adsorptionsprocesser (fysisk og kemisk adsorption) og processer som overfladekatalyseret nedbrydning, masseadsorption og kemiske reaktioner. Den adsorption, som finder sted på kolloide partikler (diameter < 0,2 μm) dannet af jordarterne, tages ikke i betragtning.

▼B

De jordparametre, som anses for at have størst betydning for adsorptionen, er: organisk kulstofindhold (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), lerindhold og jordstruktur (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) samt for ioniserbare forbindelser pH-værdien (3)(4)(42). Andre jordparametre, der kan have indflydelse på adsorptionen/desorptionen af et stof, er effektiv kationudvekslingskapacitet (ECEC), indhold af amorfe jern- og aluminiumoxider, specielt for vulkanske og tropiske jordarter (4), samt virksom overflade (49).

Testen er udviklet med henblik på vurdering af et kemisk stofs adsorption på forskellige jordtyper med varierende organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur samt pH. Testen omfatter tre trin:

**Trin 1:** Indledende undersøgelse til bestemmelse af:

— forholdet jord/opløsning

— ligevægtstid for adsorptionsprocessen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt

— prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt prøvestoffets stabilitet inden for prøveperioden.

**Trin 2:** Screeningtest: adsorptionen i fem forskellige jordtyper undersøges adsorptionskinetisk ved én enkelt koncentration og bestemmelse af fordelingskoefficienterne $K_d$ og $K_{oc}$.

**Trin 3:** Bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer til fastlæggelse af koncentrationens indflydelse på adsorptionen på jord.

Undersøgelse af desorption ved hjælp af desorptionskinetik/Freundlich desorptionsisotermer (tillæg 1).

1.3. DEFINITIONER OG ENHEDER

| Symbol | Definition | Enhed |
|---|---|---|
| $A_{t_i}$ | adsorptionsprocent til tiden $t_i$ | % |
| $A_{eq}$ | adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt | % |
| $m_s^{ads}(t_i)$ | masse prøvestof adsorberet til jorden til tiden $t_i$ | µg |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | masse prøvestof adsorberet på jorden i løbet af tidsintervallet $\Delta t_i$ | µg |
| $m_s^{ads}(eq)$ | masse prøvestof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt | µg |
| $m_0$ | masse prøvestof i prøveglasset ved adsorptionstestens begyndelse | µg |
| $m_m^{ads}(t_i)$ | masse prøvestof målt i prøve ($v_a^A$) til tidspunktet $t_i$ | µg |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | masse af stoffet i opløsningen ved adsorptionsligevægt | µg |
| $m_{soil}$ | mængde jordfase, angivet som tør masse jord | g |

▼B

| Symbol | Definition | Enhed |
|---|---|---|
| $C_{st}$ | massekoncentration af stamopløsningen af stoffet | µg $cm^{-3}$ |
| $C_0$ | initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden | µg $cm^{-3}$ |
| $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | massekoncentration af stoffet i den vandige fase til tidspunktet $t_i$ for analysens udførelse | µg $cm^{-3}$ |
| $C_s^{ads}(eq)$ | indhold af stof adsorberet på jorden ved adsoprtionsligevægt | µg $g^{-1}$ |
| $C_{aq}^{ads}(eq)$ | massekoncentration af stoffet i vandig fase ved adsorptionsligevægt | µg $cm^{-1}$ |
| $V_o$ | initialt volumen af vandig fase i kontakt med jorden under adsorptionstesten | $cm^3$ |
| $v_a^A$ | volumen af den prøve, hvro prøvestoffet måles | $cm^3$ |
| $K_d$ | fordelingskoefficient for adsorption | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_{oc}$ | normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_{um}$ | normaliseret adsorptionskoefficient for organisk kulstof | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_F^{ads}$ | Freudlich adsorptionskoefficient | $\mu g^{-1-l/n}$ $(cm^3)^{l/n}$ $g^{-1}$ |
| l/n | Freudlich-eksponent | |
| $D_{t_i}$ | desorptionsprocent til tidspunktet $t_i$ | % |
| $D_{\Delta t_i}$ | desorptionsprocent til tidsintervallet $\Delta t_i$ | % |
| $K_{des}$ | tilsyneladende desorptionskoefficient | $cm^3$ $g^{-1}$ |
| $K_F^{des}$ | Freudlich desorptionskoefficient | µg $^{1-l/n}$ $(cm^3)^{l/n}$ $g^{-1}$ |
| $m_{aq}^{des}(t_i)$ | masse af prøvestoffe desorbere fra jorden i lobet af tiden $t_i$ | µg |
| $m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ | masse af prøvestoff desorberet fra jorden i lobet af tidsintervallet $\Delta_{ti}$ | µg |
| $m_m^{des}(eq)$ | masse af stof. som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt | µg |
| $m_{aq}^{des}(eq)$ | samlet masse af prøvestof desorberet ved desorptionsligevægt | µg |
| $m_s^{des}(\Delta t_i)$ | masse af prøvestof. som stadig er adsorberet på jorden efter tidsintervallet $\Delta_{ti}$ | µg |
| $m_{aq}{}^A$ | masse af stof. som er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning | µg |
| $C_s^{des}(eq)$ | indhold af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt | µg $g^{-1}$ |

▼B

| Symbol | Definition | Enhed |
|---|---|---|
| $C_{aq}^{des}(eq)$ | massekoncentration af prøvestof i vandig fase ved desorptionsligevægt | µg $cm^{-3}$ |
| $V_T$ | samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget undført med den sekventielle metode | $cm^3$ |
| $V_R$ | rumfang supermatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning | $cm^3$ |
| $v_a^D$ | rumfang af prøve udtaget til analyse fra tidspunktet (i) under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode | $cm^3$ |
| $V_r^r$ | rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetkforsøget (parallelle metode) | $cm^3$ |
| $V_i^F$ | rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof, ved desorptionsligevægt | $cm^3$ |
| MB | massebalance | % |
| $m_E$ | samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin | µg |
| $V_{rec}$ | rumfang af supermatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt | $cm^3$ |
| $P_{ow}$ | oktanol/vand fordelingskoefficient | |
| pKa | dissociationskonstant | |
| $S_w$ | vandopløselighed | g $l^{-1}$ |

1.4. TESTMETODENS PRINCIP

Kendte rumfang af en opløsning af umærket eller radioaktivt mærket prøvestof med kendt koncentration i 0,01 M $CaCl_2$ tilsættes til jordprøver, hvis tørre vægt kendes, og som i forvejen er ekvilibreret i 0,01 M $CaCl_2$. Blandingen omrystes et passende stykke tid. Jordsuspensionerne adskilles derefter ved centrifugering og om ønsket filtrering, og den vandige fase analyseres. Den mængde prøvestof, som er adsorberet på jordprøven, beregnes som forskellen mellem den mængde prøvestof, som i begyndelsen er til stede i oplosningen og den mængde, der er tilbage ved forsøgets slutning (indirekte metode).

Om ønsket kan man vælge at bestemme den adsorberede mængde prøvestof direkte ved analyse af jorden (direkte metode). Denne metode, som indebærer trinvis ekstraktion af jorden med passende opløsningsmiddel, anbefales i tilfælde, hvor koncentrationsforskellen af stoffet i opløsningen ikke kan bestemmes nøjagtigt. Som eksempel på sådanne tilfælde kan nævnes: Prøvestoffet adsorberes på overfladen af prøveglasset, prøvestoffet er ustabilt inden for forsøgets tidsramme, adsorptionen er enten så svag, at der kun fås lille koncentrationsændring i stoffet, eller så stærk, at koncentrationen bliver for lille til at kunne bestemmes nøjagtigt. Anvendes radiomærket stof, kan ekstraktion af jorden undgås ved analyse af jordfasen ved forbrænding og væskescintillationstælling. Væskescintillationstælling er imidlertid en uspecifik teknik, som ikke gør det muligt at skelne mellem moderstof og omdannelsesprodukter; den bør derfor kun anvendes, hvis prøvestoffet er stabilt i hele undersøgelsens varighed.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Kemiske reagenser skal være af analytisk kvalitet. Det anbefales at anvende umærket prøvestof med kendt sammensætning og helst mindst 95 % renhed eller radioaktivt mærket prøvestof af kendt sammensætning og radioaktiv renhed. Anvendes radioaktive tracerstoffer med kort halveringstid, skal der korrigeres for henfald.

Før man udfører en test for adsorption-desorption, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (A.6)

b) damptryk (A.4) og/eller Henrys lovkonstant

c) abiotisk nedbrydning: hydrolyse som funktion af pH (C.7)

d) fordelingskoefficient (A.8)

e) umiddelbar biologisk nedbrydelighed (C.4) eller aerob og anaerob omdannelse i jord

f) pKa for ioniserbare stoffer

g) direkte fotolyse i vand (dvs. UV-Vis absorptionsspektrum i vand, kvanteudbytte) og fotonedbrydning på jord.

1.6. PRØVENS ANVENDELIGHED

Prøven kan anvendes på kemiske stoffer, for hvilke en analysemetode med tilstrækkelig nøjagtighed er til rådighed. En vigtig parameter, som kan have betydning for resultaternes pålidelighed, navnlig ved anvendelse af den indirekte metode, er prøvestoffets stabilitet inden for det tidsrum, testen strækker sig over. Det er således en forudsætning, at stabiliteten efterprøves i en indledende undersøgelse; iagttages der en omdannelse i løbet af den tid, testen strækker sig over, anbefales hovedundersøgelsen udført med analyse af både jord- og vandfase.

Man kan komme ud for vanskeligheder med at udføre testen for prøvestoffer med ringe vandopløselighed ($S_w < 10^{-4}$ g $l^{-1}$), såvel som for stærkt ladede stoffer som følge af, at koncentrationen i den vandige fase ikke kan bestemmes analytisk med tilstrækkelig nøjagtighed. I sådanne tilfælde må der træffes supplerende foranstaltninger. Vejledning i, hvordan sådanne problemer gribes an. er givet i de pågældende afsnit i denne metode.

Ved testning af flygtige stoffer må der drages omsorg for at undgå tab under behandlingen.

1.7. BESKRIVELSE AF METODEN

1.7.1. **Apparatur og kemiske reagenser**

Standardlaboratorieudstyr, navnlig følgende:

a) Glas eller beholdere til udførelse af forsøgene. Det er vigtigt, at disse glas eller beholdere:

— passer direkte i centrifugen, for at fejl ved håndtering og overførsel kan begrænses til det mindst mulige

— er fremstillet af ikke-reaktive materialer, således at adsorptionen af prøvestoffet på overfladen nedsættes til det mindst mulige.

▼B

b) Til omrystning anvendes overhead-rystebord eller tilsvarende; rystebordet skal holde jorden opslæmmet under omrystningen.

c) Centrifuge: helst af højhastighedstypen, f.eks centrifugalkraft > 3 000 g, temperaturkontrolleret, skal kunne fjerne partikler med diameter over 0,2 μm fra vandige opløsninger. Beholderne skal være tilproppet under omrystning og centrifugering for at undgå tab ved fordampning og væskespild; for at mindske adsorptionen på propperne bør deaktiverede propper anvendes, f.eks. teflonbelagte skruepropper.

d) Valgfrit: filtreringsapparat, sterile engangsfiltre med 0,2 μm porestørrelse. Filtermaterialet bør udvælges særligt nøje med henblik på at undgå ethvert tab af prøvestof på filtrene; til tungtopløselige prøvestoffer kan filtre af organisk materiale ikke anbefales.

e) Analyseudstyr, som er velegnet til måling af prøvestoffets koncentration.

f) Laboratorievarmeskab, som kan holde temperaturer fra 103 °C til 110 °C.

1.7.2. **Karakterisering og udvælgelse af jord**

Jorden bør være karakteriseret ved tre parametre, som i hovedsagen anses for bestemmende for adsorptionskapaciteten: organisk kulstofindhold, lerindhold og jordstruktur, samt pH. Som allerede nævnt (jf. »Område«) kan andre fysisk-kemiske jordegenskaber have betydning for et givet stofs adsorption/desorption og bør i så fald tages i betragtning.

Det har meget stor betydning, hvilke metoder der anvendes til karakterisering af jorden, og disse kan have stor indflydelse på resultaterne. Det anbefales derfor, at jordens pH måles i en opløsning af 0,01 M $CaCl_2$ (dvs. den opløsning, der benyttes ved undersøgelse af adsorption/desorption) i henhold til den pågældende ISO-metode (ISO-10390-1). Ligeledes anbefales, at de øvrige relevante jordegenskaber bestemmes efter standardmetoder (ISO Handbook of soil analysis); derved kan analysen af sorptionsdata baseres på globalt standardiserede jordparametre. Nogen vejledning vedrørende foreliggende standardmetoder til jordanalyse og -karakterisering er givet i henvisning (50-52). Til kalibrering af metoderne til jordbundsanalyse anbefales brug af referencejordtyper.

Vejledning i udvælgelse af jord til adsorptions-/desorptionsforsøgene er givet i tabel 1. De syv udvalgte jordtyper er dem, man finder i tempererede geografiske områder. For ioniserbare stoffer bør de udvalgte jordtyper dække et bredt pH-område for at give mulighed for vurdering af adsorptionen af stoffet, når dette er henholdsvis ioniseret og uioniseret. Vejledning i, hvor mange forskellige jordtyper der skal undersøges i de forskellige trin af testen, findes under 1.9. »Testens præstationer«.

Foretrækker man andre jordtyper, bør de være karakteriseret ved de samme parametre og have tilsvarende variation i egenskaber som dem, der er beskrevet i tabel 1, også selv om de ikke modsvarer kriterierne nøjagtigt.

▼B

*Tabel 1*

**Vejledning i valg af jordprøver til adsorption-desorption**

| Jordtype | pH-område (i 0,01 M $CaCl_2$) | Organisk kulstofindhold ( %) | Lerindhold ( %) | Jordstruktur (1) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,5-5,5 | 1,0-2,0 | 65-80 | clay |
| 2 | > 7,5 | 3,5-5,0 | 20-40 | clay loam |
| 3 | 5,5-7,0 | 1,5-3,0 | 15-25 | silt loam |
| 4 | 4,0-5,5 | 3,0-4,0 | 15-30 | loam |
| 5 | < 4,0-6,0 (2) | < 0,5-1,5 (2) (3) | < 10-15 (2) | loamy sand |
| 6 | > 7,0 | < 0,5-1,0 (2) (3) | 40-65 | clay loam/clay |
| 7 | \|< 4,5 | > 10 | < 10 | sand/loamy sand |

(1) I henhold til FAO og US-systemet (85).
(2) Værdierne af de respektive variable bør fortrinsvis ligge i det anførte område. Hvis det imidlertid er vanskeligt at finde passende jordmateriale, kan værdier under den anførte mindsteværdi godtages.
(3) For jordtyper med mindre end 0,3 % organisk kulstof kan sammenhængen mellem organisk kulstofindhold og adsorption være forstyrret. Det anbefales således at anvende jord med et organisk kulstofindhold på mindst 0,3 %.

1.7.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.7.3.1. *Indsamling*

Der anbefales ikke bestemte prøveudtagningsmetoder eller -redskaber; prøveudtagningsmetoden afhænger af undersøgelsens formål (53)(54)(55)(56)(57){58).

Følgende bør tages i betragtning:

a) Udførlige oplysninger om områdets historie er nødvendige, herunder beliggenhed, plantedække, behandling med pesticider og/eller gødning, biologisk tilvækst eller tilfældig forurening. Anbefalingerne i ISO-standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6) bør følges med hensyn til beskrivelse af prøvetagningsstedet.

b) Prøvetagningsstedet skal være fastlagt ved UTM (universel transversal Mercator-projektion/europæisk horisontal datum) eller geografiske koordinater; dette skulle gøre det muligt at genfinde en bestemt jordtype i fremtiden og kan være en hjælp ved bestemmelse af jorden efter forskellige klassifikationssystemer, som anvendes i andre lande. Endvidere må kun indsamles A-horisont til en maksimal dybde af 20 cm. Specielt gælder for jordtype n.7, at hvis en $O_h$-horisont indgår i jorden, bør den medtages ved prøveindsamlingen.

Jordprøverne bør transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at der med sikkerhed ikke sker nævneværdige ændringer i jordens oprindelige egenskaber.

▼B

1.7.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Kun når dette ikke er muligt, bør jorden opbevares ved rumtemperatur i lufttørret tilstand. Der anbefales ingen grænse for opbevaringstiden, men har jorden været opbevaret i over tre år, bør den før anvendelse genanalyseres for organisk kulstofindhold, pH og kationbytningskapacitet.

1.7.3.3. *Håndtering og klargøring af jordprøver til testen*

Jordprøverne lufttørres ved rumtemperatur (fortrinsvis ved 20-25 °C). Disaggregering bør foretages med mindst mulig kraft, således at den oprindelige jordstruktur ændres mindst muligt. Jordens sigtes til en partikelstørrelse ≤ 2 mm; ved sigtningen følges anbefalingerne i ISO-standarden for jordprøvetagning (ISO 10381-6). Skånsom homogenisering anbefales, da reproducerbarheden af resultaterne derved øges. Fugtindholdet i hver jordtype bestemmes på tre prøver ved opvarmning til 105 °C, indtil vægten ikke længere ændrer sig væsentligt (ca. 12 h). I alle beregninger forstås ved masse af jord den ovntørrede masse, dvs. jordens vægt korrigeret for fugtindhold.

1.7.4. **Klargøring af prøvestof, som skal tilføres jorden**

Prøvestoffet opløses i 0,01 M $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand; $CaCl_2$-opløsningen anvendes som vandig fase for at forbedre centrifugeringen og nedsætte kationbytningen til det mindst mulige. Stamopløsningens koncentration bør fortrinsvis være tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for den anvendte analysemetode. Denne grænse garanterer nøjagtige målinger med hensyn til de her anviste metoder; endvidere bør stamopløsningens koncentration være lavere end prøvestoffets opløselighed i vand.

Stamopløsningen bør fortrinsvis fremstilles umiddelbart før stoffet tilføres jordprøverne og bør opbevares tillukket og mørkt ved 4 °C. Opbevaringstiden afhænger af prøvestoffets stabilitet og dets koncentration i opløsningen.

Kun ved tungtopløselige stoffer ($S_w < 10^{-4}$ g $l^{-1}$) kan det være nødvendigt at anvende et passende opløsningsmiddel, når prøvestoffet er vanskeligt at bringe i opløsning. For dette opløsningsmiddel gælder; a) det bør være blandbart med vand, som f.eks. methanol eller acetonitril; b) dets koncentration bør ikke være større end svarende til 1 % af stamopløsningens samlede rumfang og bør være mindre i den opløsning af prøvestof, som kommer i kontakt med jorden (helst under 0,1 %), og c) det bør ikke være overfladeaktivt eller indgå i lyolytiske reaktioner med prøvestoffet. Brug af opløsningsmiddel bør være angivet og begrundet i rapporteringen af data.

Et andet alternativ ved tungtopløselige stoffer er at tilsætte prøvestoffet til prøvesystemet ved spiking: Prøvestoffet opløses i et organisk opløsningsmiddel, og en lille del heraf tilsættes systemet bestående af jord og 0,01 molær opløsning af $CaCl_2$ i destilleret eller deioniseret vand. Indholdet af organisk opløsningsmiddel i den vandige fase skal holdes så lavt som muligt, normalt ikke over 0,1 %. Spiking fra en organisk opløsning kan være behæftet med manglende reproducerbarhed af volumen. Derved kan der indføres en ekstra fejlkilde i forsøget, da koncentrationen af prøvestof og hjælpeopløsningsmiddel ikke vil være den samme i alle test.

▼B

1.8. BETINGELSER FOR UDFØRELSE AF ADSORPTIONS-/DESORPTIONSTESTEN

1.8.1. **Analysemetode**

De vigtigste parametre, som kan påvirke nøjagtigheden af sorptionsmålingerne, er nøjagtigheden af analysemetoden anvendt til både opløsningsfase og adsorberet fase, prøvestoffets stabilitet og renhed, om sorptionsligevægt opnås, hvor meget opløsningens koncentration ændrer sig, forholdet jord/opløsning og ændringer i jordstrukturen under ekvilibreringen (35)(59-62). Nogle eksempler med relevans for nøjagtigbedsproblematikken er givet i tillæg 2.

Pålideligheden af den anvendte analysemetode skal være kontrolleret i det koncentrationsområde, som forventes at optræde under testen. Eksperimentatoren bør ikke afholde sig fra selv at udvikle en velegnet metode med passende nøjagtighed, præcision, reproducerbarhed, detektionsgrænser og genfindingsgrad. Nedenfor er givet en forsøgsvejledning, som viser udførelsen af en sådan test.

Et passende rumfang 0,01 M $CaCl_2$, f.eks. 100 $cm^3$, omrystes i 4 h med en afvejet mængde jord, f.eks. 20 g, med stor adsoptionsevne, dvs. stort organisk kulstofindhold; der kan afviges fra de angivne vægtmængder og rumfang afhængigt af, hvad hensynet til analysen kræver, men et forhold jord/opløsning på 1:5 vil være et passende udgangspunkt. Blandingen centrifugeres, og den vandige fase kan eventuelt filtreres. Til den vandige fase tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøvestof, således at den nominelle koncentration når inden for det koncentrationsområde, der forventes at optræde under testen. Dette rumfang bør højst udgøre 10 % af den vandige fases endelige rumfang, for at forekvilibreringsopløsningens beskaffenhed skal ændres mindst muligt. Opløsningen analyseres.

Én blindprøve bestående af systemets jord + $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof) skal indgå i analysen, for at man kan kontrollere, om analysemetoden medfører artefakter, og om jorden giver matrixvirkninger.

Til sorptionsmåling kan anvendes gas-væskekromatografi (GLC), high-performance væskekromatografi (HPLC), spektrometri (f.eks. GC/massespektrometri, HPLC/massespektrometri) og væskescintillationstælling (ved radioaktivt mærket prøvestof). Uanset den anvendte analysemetode anses det for passende, hvis der genfindes mellem 90 % og 110 % af den nominelle værdi. For at give mulighed for detektion og evaluering efter at adskillelse af faserne har fundet sted, bør analysemetodens detektionsgrænser være mindst to størrelsesordener under den nominelle koncentration.

Karakteristika og detektionsgrænser for den analysemetode, der er til rådighed for adsorptionsundersøgelserne, spiller en vigtig rolle ved fastlæggelse af testbetingelserne og testens samlede præstationer. I denne metode angives en generel forsøgsgang, medens der gives anvisninger og vejledning for alternative løsninger, hvor analysemetode og laboratoriefaciliteter kan sætte begrænsninger.

▼B

1.8.2. **Valg af optimalt jord/opløsning-forhold**

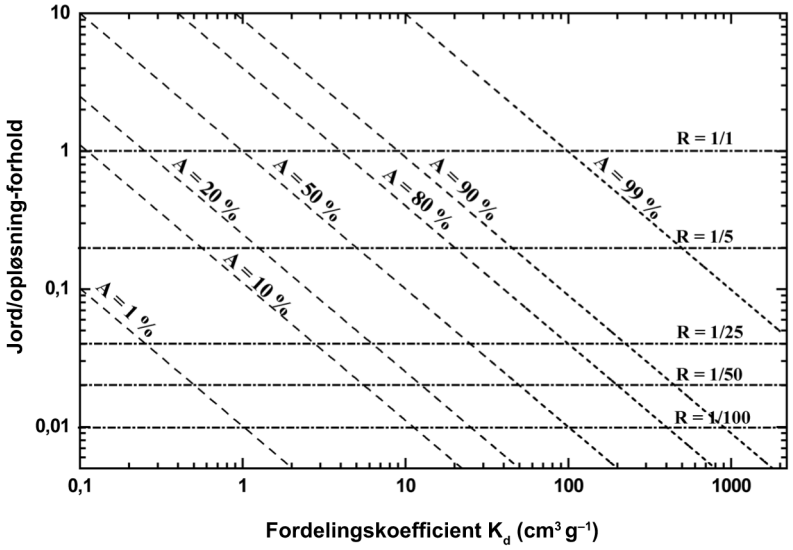
Et passende jord til opløsning forhold for sorptionsundersøgelser vælges ud fra fordelingskoefficienten $K_d$ og den ønskede relative adsorptionsgrad. Den statistiske nøjagtighed, med hvilken stoffets koncentration i opløsningen lader sig bestemme, er givet ved koncentrationsændringen for stoffet i opløsningen, afhængigt af adsorptionsligningens form og analysemetodens grænseværdi. I praksis er det derfor sædvanligvis nyttigt at bestemme sig for nogle få faste forhold, som giver en adsorptionsprocent på over 20 %, helst også > 50 % (62), samtidig med at man sørger for, at prøvestoffets koncentration i den vandige fase er høj nok til at kunne måles nøjagtigt. Dette er særlig vigtigt ved høje adsorptionsprocenter.

En bekvem måde at vælge passende jord/vandforhold på er at basere det på en skønnet $K_d$-værdi, enten fra de indledende forsøg eller fra tilnærmet beregning med en anerkendt metode (tillæg 3). Derefter kan et passende forhold jord/opløsning vælges ved afsætte en kurve over dette forhold som funktion af $K_d$ for fastlagte adsorptionsprocenter (figur1). Ved optegning af kurven antages adsorptionsligningen lineær ([1]). Det pågældende forhold findes ved at omordne ligning 4 for $K_d$ i samme form som ligning 1:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left( \frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

eller i logaritmisk form, idet det forudsættes, at $R = m_{soil}/V_0$ og $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[ \frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$




*Figur 1.* Sammenhæng mellem forholdet jord/opløsning og $K_d$ ved forskellige adsorptionsprocenter for prøvestof.

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Figur 1 viser det ønskede jord/opløsningsforhold som funktion af $K_d$ ved forskellige adsorptionsgrader. F.eks. fås med et forhold jord/opløsning på 1:5 og $K_d$ = 20 en adsorption på ca. 80 %. For at få 50 % adsorption ved samme $K_d$-værdi skal forholdet være 1:25. Denne måde at vælge passende jord/opløsningsforhold på giver undersøgeren den fleksibilitet, som er nødvendig under forsøgsomstændigheder.

Vanskeligere at håndtere er de områder, hvor det kemiske stof udviser enten meget høj eller meget lav adsorption. I tilfælde af lav adsorption anbefales et jord/opløsningsforhold på 1:1, dog kan det for visse meget organiske jordtyper være nødvendigt med et lavere forhold for at få en vællinglignende konsistens. Der må vises omhu med analysemetoden ved måling af små ændringer i opløsningens koncentration; ellers vil adsorptionsmålingen blive unøjagtig. Hvis fordelingskoefficienten $K_d$ på den anden side er meget høj, kan man gå op til et forhold jord/opløsning på 1:100 for at en væsentlig del af det kemiske stof skal forblive i opløsningen. Der må dog sørges omhyggeligt for god opblanding, og man må give systemet tilstrækkelig tid til at ekvilibreres, En alternativ fremgangsmåde er at forudsige $K_d$-værdien med teknikker til skønsvis beregning, f.eks. baseret på $P_{ow}$-værdier (tillæg 3), Især kan dette være nyttigt for lavt adsorberede/polære kemiske stoffer med $P_{ow} < 20$ og for lipofile/stærkt sorptive kemiske stoffer med $P_{ow} > 10^4$.

1.9. TESTENS PRÆSTATIONER

1.9.1. **Testbetingelser**

Alle forsøg udføres ved rumtemperatur, og om muligt ved konstant temperatur mellem 20 ºC og 25 ºC.

Centrifugeringsbetingelserne skal gøre det muligt at fjerne partikler større end 0,2 μm fra opløsningen. Denne værdi medtager den mindste partikel, der betragtes som en faststofpartikel, og danner overgangen mellem faste og kolloide partikler. Vejledning for fastlæggelse af centrifugeringsbetingelserne findes i tillæg 4.

Kan centrifugeringsfaciliteterne ikke garantere fjernelse af partikler over 0,2 μm, kan man eventuelt kombinere centrifugeringen med filtrering med filtre med 0,2 μm porestørrelse. Sådanne filtre skal være fremstillet af passende inaktivt materiale for at undgå tab af prøvestof på dem. Under alle omstændigheder skal det være godtgjort, at filtreringen ikke medfører tab af prøvestof.

1.9.2. **Trin 1 — Indledende undersøgelse**

Formålet med den indledende undersøgelse er beskrevet i afsnittet »Område«. Vejledning for opsætning af en sådan test gives i forbindelse med det nedenfor foreslåede forsøg.

1.9.2.1. *Valg af optimalt forhold jord/opløsning*

Der anvendes to jordtyper og tre forskellige jord/opløsningforhold (seks enkeltforsøg). Den ene jordtype har højt organisk kulstofindhold og lavt lerindhold, medens den anden har lavt organisk kulstofindhold og højt lerindhold. Der foreslås følgende forhold:

— 50 g jord til 50 $cm^3$ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:1)

▼B

— 10 g jord til 50 $cm^3$ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:5)

— 2 g jord til 50 $cm^3$ vandig opløsning af prøvestoffet (forhold 1:25).

Den mindste mængde jord, som forsøget kan gennemføres på, afhænger af laboratoriefaciliteterne og præstationerne af de anvendte analysemetoder. Dog anbefales det at anvende mindst 1 g, og helst 2 g for at få pålidelige resultater af testen.

Én kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (ingen jord), underkastes nøjagtig de samme procedurer som prøvesystemerne for at kontrollere prøvestoffets stabilitet i $CaCl_2$-opløsning og dets eventuelle adsorption på overfladen af prøvekarrene.

For hver jordtype gennemføres samme testprocedure på en blindprøve med samme jordmængde og et totalt rumfang på 50 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden prøvestof). Blindprøven tjener til baggrundskontrol under analysen med henblik på at opdage forstyrrende stoffer eller forurenet jord.

Alle forsøgene, herunder kontrol- og blindforsøg, skal udføres mindst som dobbeltforsøg. Det samlede antal prøver, som skal fremstilles til forsøget, kan beregnes ud fra den metode, der skal anvendes.

Sædvanligvis benyttes samme metoder ved forundersøgelsen og hovedundersøgelsen; undtagelser herfra nævnes i givet fald.

Dagen før forsøgsdagen ekvilibreres de lufttørrede jordprøver ved omrystning med et mindsterumfang på 45 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$ natten over (12 h). Derefter tilsættes et bestemt rumfang af stamopløsningen af prøve-stoffet, således at det endelige rumfang justeres til 50 $cm^3$. Dette tilsatte rumfang stamopløsning: a) må ikke være over 10 % af det endelige rumfang på 50 $cm^3$ af den vandige fase for ikke at ændre beskaffenheden af forekvilibreringsopløsningen mere end nødvendigt, og b) bør fortrinsvis resultere i, at den prøveopløsning, som er i kontakt med jorden ($C_0$), har en begyndelseskoncentration mindst to størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden; denne grænse sikrer, at der kan foretages nøjagtige målinger, selv når der optræder stærk adsorption (> 90 %), og giver mulighed for senere bestemmelse af adsorptionsisotermerne. Ligeledes anbefales det, at begyndelseskoncentrationen af det undersøgte stof ($C_0$) ikke er større end halvdelen af dets opløselighed.

Nedenfor er givet et eksempel på, hvordan stamopløsningens koncentration ($C_{st}$) beregnes. Det antages, at detektionsgrænsen er 0,01 μg $cm^{-3}$, og at adsorptionen er 90 %; begyndelseskoncentrationen af prøvestoffet, som er i kontakt med jorden, bør derfor helst være 1 μg $cm^{-3}$ (to størrelsesordener over detektionsgrænsen). Når det forudsættes, at der tilsættes det anbefalede maksimale rumfang stamopløsning, dvs. 5 $cm^3$ til 45 $cm^3$0,01 M $CaCl_2$ ekvilibreringsopløsning (= 10 % stamopløsning i 50 $cm^3$ samlet vandigt rumfang), bør koncentrationen af stamopløsningen være 10 μg $cm^{-3}$, altså tre størrelsesordener over detektionsgrænsen for analysemetoden.

pH af den vandige fase bør måles før og efter kontakt med jorden, da den spiller en vigtig rolle i hele adsorptionsprocessen, navnlig for ioniserbare stoffer.

▼B

Blandingen omrystes godt, indtil adsorptionsligevægt er nået. Ligevægtstiden i jord er stærkt varierende og afhænger af det kemiske stof og af jorden; et tidsrum på 24 h er sædvanligvis tilstrækkeligt (77). I forundersøgelsen kan prøverne udtages sekventielt gennem en omrystningsperiode på 48 h (f.eks. 4. 8, 24, 48 h). Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt under hensyntagen til laboratoriets arbejdsplan.

For analyse af prøvestoffet i den vandige opløsning er der to valgmuligheder: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Det må understreges, at skønt den parallelle metode er forsøgsmæssigt mere langstrakt, er den matematiske behandling af resultaterne enklere (tillæg 5). Hvilken metode man vil vælge, er imidlertid op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

a) Den parallelle metode: Der fremstilles prøver med ens jordopløsningforhold, idet antal prøver skal være lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Efter centrifugering og (om ønsket) filtrering opsamles den vandige fase i første prøveglas så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 4 h, væsken i det andet prøveglas efter 8 h, i det tredje prøveglas efter 24 h osv.

b) Den sekventielle metode: Der fremstilles kun en dobbeltprøve for hvert forhold jordopløsning. Ved fastlagte tidsintervaller centrifugeres blandingen for at skille faserne. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Filtreres der efter centrifugeringen, bør laboratoriet have de nødvendige faciliteter til filtrering af små vandige prøver. Det anbefales, at det samlede rumfang af de udtagne prøver ikke udgør over 1 % af opløsningens samlede rumfang, således at man ikke ændrer forholdet jordopløsning væsentligt og nedsætter massen af opløst stof, som er til rådighed for adsorption under testen.

Adsorptionsprocenten $A_{t_i}$ beregnes for hvert tidspunkt ($t_i$) på grundlag af den nominelle begyndelseskoncentration og den målte koncentration på prøvetagningstidspunktet ($t_i$), korrigeret for blindværdien. Grafer over som $A_{t_i}$ -funktion af tiden (Figur 1, tillæg 5) optegnes for at vurdere, om der er nået et ligevægtsplateau ([1]). $K_d$-værdien ved ligevægt beregnes ligeledes. På grundlag af denne $K_d$-værdi vælges passende forhold jord/opløsning i figur 1, således at adsorptionsprocenten kommer over 20 %, og helst > 50 % (61). Alle de pågældende ligninger og principper for grafisk afbildning er givet i afsnittet om data og rapportering i tillæg 5.

1.9.2.2. *Bestemmelse af ekvilibreringstid for adsorptionen og mængde prøvestof adsorberet ved ligevægt*

Som nævnt giver grafer over $A_{t_i}$ eller $C_{aq}^{ads}$ som funktion af tiden mulighed for vurdere, om der er nået adsorptionsligevægt, samt den adsorberede mængde prøvestof ved ligevægt. Figur 1 og 2 i tillæg 5 viser eksempler på sådanne afbildninger. Ekvilibreringstiden er den tid, systemet behøver for at nå et plateau.

([1]) Kurver over koncentrationen af prøvestof i den vandige fase $\left(C_{aq}^{ads}\right)$ som funktion af tiden kunne også anvendes til at vurdere, om der nås et ligevægtsplateau (se fig. 2 i tillæg 5).

▼B

Hvis der med en given jord ikke nås et plateau, men fås en konstant stigende værdi, kan det skyldes komplicerende faktorer som biologisk nedbrydning eller langsom diffusion. Biologisk nedbrydning kan påvises ved, at forsøget gentages med en steriliseret prøve af jorden. Hvis der heller ikke i dette tilfælde nås et plateau, bør eksperimentatoren søge efter andre fænomener, som kan tænkes at gøre sig gældende i netop hans undersøgelser; dette kan ske gennem passende ændringer af forsøgsbetingelserne (temperatur, omrystningstid, jord/opløsningforhold). Det er op til eksperimentatoren at afgøre, om testen skal fortsættes, uanset at det måske ikke lykkes at nå ligevægt.

1.9.2.3. *Adsorption af prøvestof på overfladen af prøvebeholderne og prøvestoffets stabilitet*

Ved at analysere kontrolprøverne kan man skaffe sig en del oplysninger om prøvestoffets adsorption på overfladen af prøvebeholderne samt dets stabilitet. Hvis der iagttages en udtynding, som er større end svarende til middelfejlen på analysemetoden, kan der være tale om abiotisk nedbrydning og/eller adsorption på overfladen af prøveglassene. Man vil kunne skelne mellem disse to fænomener ved at vaske prøveglassets vægge grundigt med et kendt volumen af et passende opløsningsmiddel og derefter analysere vaskeopløsningen for prøvestoffet. Hvis der ikke konstateres adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene, er udtyndingen et bevis på abiotisk ustabilitet af prøvestoffet. Hvis der findes adsorption, må der anvendes prøveglas af andet materiale. De af dette forsøg afledte oplysninger om adsorption af prøvestof på overfladen af prøveglassene kan imidlertid ikke overføres direkte til jord/opløsningforsøget. Tilstedeværelsen af jord vil indvirke på denne adsorption.

Supplerende oplysninger om prøvestoffets stabilitet kan fås ved bestemmelse af massebalancen for moderstoffet i tid. Dette indebærer, at den vandige fase, ekstrakterne af jord samt prøvekammerets vægge analyseres for prøvestof. Forskellen mellem massen af tilsat prøvestof og summen af masserne af prøvestof i den vandige fase, ekstrakterne fra jord og fra prøveglassets vægge er lig den masse, som er nedbrudt og/eller fordampet og/eller ikke ekstraheret. For at massebalancen kan beregnes, bør der være nået adsorptionsligevægt inden for forsøgsperioden.

Massebalancen beregnes for begge jordprøver og for ét jord/opløsningforhold for hver jordtype, som giver en udtynding over 20 % og helst > 50 % ved ligevægt. Når forsøget til fastlæggelse at forholdet jord/opløsning er fuldført med analyse af den sidste prøve af den vandige fase efter 48 h, adskilles faserne ved centrifugering og, om ønsket, filtrering. Der opsamles så meget som muligt af den vandige fase, og til jorden tilsættes et passende ekstraktionsopløsningsmiddel (ekstraktionskoefficient mindst 95 %) for at ekstrahere prøvestoffet. Det anbefales at foretage mindst to på hinanden følgende ekstraktioner. Mængden af prøvestof i ekstrakterne fra jord og prøveglas bestemmes, og massebalancen beregnes (ligning 10, data og rapportering). Hvis den er mindre end 90 %, regnes prøvestoffet for ustabilt inden for testperioden. Undersøgelserne kan dog i så tilfælde fortsættes, idet der tages hensyn til prøvestoffets ustabilitet; det anbefales da at analysere begge faser i hovedundersøgelsen.

▼B

1.9.2.4. *Trin 2 — Adsorptionskinetik ved én prøvestofkoncentration*

Der anvendes fem jordtyper, udvalgt fra tabel 1. Det vil være en fordel, hvis nogle af eller alle de anvendte jordtyper fra forundersøgelsen i givet fald er med blandt disse fem jordtyper. Derved undgår man at gentage trin 2 for de jordtyper, der er anvendt i forundersøgelsen.

Ekvilibreringstiden, forholdet jord/opløsning, jordprøvens vægt, rumfanget af vandig fase i berøring med jorden og prøvestoffets koncentration i opløsningen vælges på grundlag af resultaterne af forundersøgelsen. Analyse bør helst finde sted efter ca. 2, 4, 6, 8 (eventuelt også 10) og 24 h kontakttid: omrystningstiden kan strækkes til højst 48 h i tilfælde af, at prøvestoffet kræver længere ekvilibreringstid ud fra de resultater, der danner grundlag for fastlæggelse af opblandingsforholdet. Analysetidspunkterne bør dog opfattes fleksibelt.

Hvert forsøg (ét med jord og ét med opløsning) gennemføres mindst som dobbeltforsøg, for at resultaternes overensstemmelse kan vurderes. I hvert forsøg skal indgå én blindprøve. Denne består af jord og 0,01 M $CaCl_2$ opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og rumfang identisk med forsøgets. En kontrolprøve, alene indeholdende prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) underkastes samme testprocedure for at sikre mod det uventede.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt $A_{t_i}$ og/eller tidsinterval $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af behov) og afsættes mod tiden. Desuden beregnes fordelingskoefficienten $K_d$ ved ligevægt og den normaliserede adsorptionskoefficient $K_{oc}$ for organisk kulstof (for upolære organiske stoffer).

Resultaterne af adsorptionskinetikforsøget

Den lineære $K_d$-værdi giver sædvanligvis en nøjagtig beskrivelse af sorptionsforholdene i jord (35)(78) og er et udtryk for den iboende mobilitet af kemiske stoffer i jord. For eksempel anses kemiske stoffer med $K_d \leq 1$ $cm^3$ $g^{-1}$ sædvanligvis for kvalitativt mobile. Tilsvarende har MacCall et al. (16) opstillet et system til opdeling efter mobilitet, baseret på $K_{oc}$-værdier. Endvidere findes der klassifikationssystemer for udvaskning, baseret på sammenhængen mellem $K_{oc}$ og DT-50 ([1]) (32)(79).

1 henhold til fejlanalyseundersøgelser (61) kan $K_d$-værdier under 0,3 $cm^3$ $g^{-1}$ desuden ikke beregnes nøjagtigt ud fra et fald i koncentrationen i den vandige fase, selv når der anvendes det (fra en nøjagtighedssynsvinkel) gunstigste forhold jord/opløsning, dvs. 1:1. I så tilfælde anbefales det analysere begge faser — jord og opløsning.

([1]) DT-50: den tid, der forløber, til 50 % af prøvestoffer er nedbrudt.

▼B

Vedrørende ovenstående bemærkninger anbefales det. at undersøgelsen af adsorptionsforholdene for et kemisk stof i jord og dets potentielle mobilitet fortsættes med bestemmelse af Freundlich-adsorptionsisotermer for disse systemer, for hvilke $K_d$ kan bestemmes nøjagtigt ved brug af forsøgsprotokollen i denne testmetode. Nøjagtig bestemmelse er mulig, såfremt multiplikation af $K_d$ med forholdet jord/opløsning giver en værdi > 0,3, når målingerne baseres på koncentrationsfaldet i den vandige fase (indirekte metode), hhv. > 0,1 når begge faser analyseres (direkte metode) (61).

1.9.2.5. *Trin 3 — Adsorptionsisotermer og desorptionskinetik/ desorptionsisotermer*

1.9.2.5.1. Adsorptionsisotermer

Der anvendes fem prøvestofkoncentrationer, helst således at de spænder over to størrelsesordener; valg af disse koncentrationer bør ske på grundlag af vandopløseligheden og den resulterende ligevægtskoncentration i vand. For hver jordtype bør anvendes samme forhold jord/opløsning i hele undersøgelsen. Adsorptionstesten udføres som ovenfor beskrevet, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang efter forløb af den nødvendige tid til indtræden af ligevægt som tidligere bestemt i trin 2. Ligevægtskoncentrationerne i opløsningen bestemmes, og den adsorberede mængde beregnes enten ud fra svindet af prøvestof i opløsningen eller ved hjælp af den direkte metode. Den adsorberede masse pr. masseenhed jord afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet (se »Data og rapportering«).

Resultater af bestemmelsen af adsorptionsisotermer

Af de matematiske adsorptionsmodeller, som hidtil er foreslået, er Freundlich-isotermen den oftest anvendte til beskrivelse af adsorptionsprocesser. Mere udførlige oplysninger om fortolkning og betydning af adsorptionsmodeller er givet i henvisning (41)(45)(S0)(81)(S2).

**Anmærkning:** Det skal nævnes, at man ikke kan sammenholde værdierne af $K_F$ (Freundlich-adsorptionskoefficienten) for forskellige stoffer, medmindre de pågældende $K_F$-værdier udtrykkes i samme enheder (83).

1.9.2.5.2. Desorptionskinetik

Formålet med dette forsøg er at undersøge, om et kemisk stof adsorberes reversibelt eller irreversibelt til en jordtype. Denne oplysning er vigtig, da også desorptionsprocessen spiller en vigtig rolle for et kemisk stofs opførsel i jord på en given lokalitet. Desuden er desorptionsdata nyttige som inddata for computermodeller af et stofs udvaskning og afstrømning i opløst form. Ønskes en desorptionsundersøgelse, anbefales det at udføre nedenstående undersøgelse på hvert system, for hvilket det var muligt at bestemme $K_d$ nøjagtigt i det foregående adsorptionskinetikforsøg.

Ligesom for adsorptionskinetikundersøgelsen kan der vælges: a) den parallelle metode og b) den sekventielle metode. Valg af metode er op til eksperimentatoren, som må tage hensyn til de forhåndenværende laboratoriefaciliteter og ressourcer.

▼B

a) Den parallelle metode: For hver jordtype, som udvælges til desorptionsundersøgelsen, fremstilles prøver med ens jord/opløsning forhold, således at antal prøver er lig det antal tidsintervaller, hvori adsorptionskinetikken ønskes undersøgt. Tidsintervallerne bør helst være de samme som i adsorptionskinetikforsøget; dog kan den samlede tid om nødvendigt forlænges, for at systemet kan nå desorptionsligevægt. I hvert forsøg (én jordtype, én opløsning), køres én blindprøve. Blindprøven består af jord og 0,01 M $CaCl_2$-opløsning uden stofprøve og med henholdsvis vægt og volumen identisk med forsøgets. Som kontrolprøve underkastes prøvestof i 0,01 M $CaCl_2$-opløsning (uden jord) samme testprocedure. Alle blandingerne af jord og opløsning omrystes, til adsorptionsligevægt er nået {som tidligere bestemt i trin 2). Derefter adskilles faserne ved centrifugering, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof, og de nye blandinger omrystes igen. Den vandige fase i første prøveglas opsamles så fuldstændig som muligt og måles efter f.eks. 2 h, væsken i det andet prøveglas efter 4 h, i det tredje prøveglas efter 6 h, osv., indtil desorptionsligevægt er nået.

b) Den sekventielle metode: Efter adsorptionskinetikforsøget centrifugeres blandingen, og den vandige fase fjernes så fuldstændigt som muligt. Det fjernede rumfang væske erstattes af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$ uden prøvestof. Den nye blanding omrystes, indtil desorptionsligevægt er nået. I dette tidsrum centrifugeres blandingen ved fastlagte tidsintervaller, så faserne adskilles. En lille prøve af den vandige fase analyseres straks for prøvestof; derefter fortsætter forsøget med den oprindelige blanding. Rumfanget af hver enkelt prøve skal være mindre end 1 % af det samlede rumfang. Der tilsættes samme mængde frisk fremstillet 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til blandingen for at bevare uændret forhold mellem jord og opløsning, og omrystningen fortsætter indtil næste tidsinterval.

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert tidspunkt ($(D_{t_i})$) og/eller tidsinterval ($(D_{\Delta t_i})$) (afhængigt af, hvad undersøgelsen kræver) og afsættes mod tiden. Desorptionskoefficienten $K_{des}$ ved ligevægt beregnes ligeledes. Alle de ligninger, som skal anvendes, er givet i afsnittet »Data og rapportering« og i tillæg 5.

Resultater af desorptionskinetikforsøget

Fælles afbildninger af desorptionsprocenten $D_{t_i}$ og adsorptionsprocenten $A_{t_i}$ som funktion af tiden giver mulighed for at at vurdere adsorptionsprocessens reversibilitet. Hvis desorptionsligevægt nås. selv om det tager dobbelt så lang tid som at nå adsorptionsligevægt, og hvis den samlede desorption udgør over 75 % af den adsorberede mængde, anses adsorptionen for reversibel.

1.9.2.5.3. Desorptionsisotermer

Freundlich-desorptionsisotermer bestemmes for de jordtyper, som anvendes i forsøget til bestemmelse af adsorptionsisotermer. Desorptionstesten udføres som beskrevet i afsnittet »Desorptionskinetik«, blot med den forskel, at den vandige fase kun analyseres én gang, ved desorptionsligevægt. Den samlede masse desorberet prøvestof beregnes. Indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, afsættes som funktion af ligevægtskoncentrationen af prøvestoffet i opløsningen (se »Data og rapportering« samt tillæg 5).

▼B

2. **DATA OG RAPPORTERING**

Analysedata fremlægges i tabelform (se tillæg 6). Enkeltmålinger og beregnede gennemsnit angives. Der gives grafiske fremstillinger af adsorptionsisotermerne. Beregningerne foretages som nedenfor beskrevet.

I forsøget sættes vægten af 1 $cm^3$ vandig opløsning til 1 g. Forholdet jord/opløsning kan angives i enheder w/w eller w/vol. med samme talværdi.

2.1. ADSORPTION

Adsorptionen ($A_{t_i}$) defineres som den procentdel af det fra forsøgets begyndelse tilstedeværende stof, som adsorberes på jorden under de givne forsøgsbetingelser. Såfremt prøvestoffet er stabilt og ikke i nævneværdig grad adsorberes til beholderens væg, beregnes adsorptionsprocenten $A_{t_i}$ til hvert af tidspunkterne $t_i$ efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

hvor:

$A_{t_i}$ = adsorptionsprocent til tiden $t_i$ ( %)

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden til tiden $t_i$ (µg)

$m_0$ = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan den procentuelle adsorption $A_{t_i}$ beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, findes i tillæg 5.

Fordelingskoefficienten $K_d$ er forholdet mellem indholdet af stoffet i jordfasen og massekoncentrationen af stoffet i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af ligevægt.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

hvor:

$C_s^{ads}(eq)$ = indhold af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg $g^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved adsorptionsligevægt (µg $cm^{-3}$). Koncentrationen bestemmes ved analyse under hensyntagen til resultaterne af blindprøverne

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (µg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (µg)

$m_{soil}$ = mængde jordfase, angive; som tor masse af jord (g)

$V_0$ = begyndelsesrumfang af vandig fase i kontakt med jorden ($cm^3$).

Forholdet mellem $A_{eq}$ og $K_d$ er givet ved;

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

hvor:

$A_{eq}$ = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt, %.

Den normaliserede adsorptionskoefficient for organisk kulstof $K_{oc}$ angiver sammenhængen mellem fordelingskoefficienten $K_d$ og jordprøvens organiske kulstofindhold:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

hvor:

% oc = procentdel organisk kulstof i jordprøven (g $g^{-1}$).

$K_{oc}$-koefficienten angiver ved én enkelt værdi fordelingen af hovedsagelig ikke-polære organiske stoffer mellem organisk kulstof i jord eller slam og vand. Adsorptionen af sådanne kemiske stoffer er korreleret med det organiske indhold af det sorberende faste stof (7); således afhænger $K_{oc}$-værdierae af de særlige karakteristika af humusfraktionerne, hvis sorptionsevne afviger betydeligt som følge af forskelle i oprindelse, tilblivelse osv.

2.1.1. **Adsorptionsisotermer**

Freundlich-adsorptionsisotermligningen giver sammenhængen mellem den adsorberede mængde prøvestof og koncentrationen af opløst prøvestof ved ligevægt (ligning 8).

Data behandles som angivet under »Adsorption«, og for hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof adsorberet på jorden efter adsorptionstesten $C_s^{ads}(eq)$) (andetsteds betegnet x/m). Det antages, at der er indtrådt ligevægt, og at $C_s^{ads}(eq)$ udtrykker ligevægtsværdien:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlich-adsorptionsligningen er vist i (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

hvor:

$K_F^{ads}$ = Freundlich-adsorptionskoefficient; den har kun dimensionen $cm^3\ g^{-1}$, såfremt l/n = 1: i alle andre tilfælde indføres hældningen l/n i dimensionen af $K_F^{ads}$ ($\mu g^{1-1/n}$ ($cm^{31/n}\ g^{-1}$)

n = regressionskonstant; l/n ligger sædvanligvis i intervallet 0,7-1,0, hvilket viser, at sorptionsdata ofte er let ulineære.

Ligning 8 og 9 afsættes, og værdierne af $K_F^{ads}$ og l/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 9. Korrelationskoefficienten $r^2$ for den logaritmiske ligning beregnes ligeledes. Et eksempel på sådanne afbildninger er givet i figur 2.

▼B

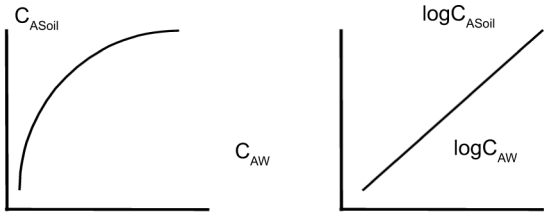



**Fig. 2.** Freundlich adsoprtionskurve, normal og lineariseret.

2.1.2. **Massebalance**

Massebalancen (MB) defineres som den procentdel af den nominelle mængde stof ved testens begyndelse, som kan genfindes analytisk efter en adsorptionstest.

Behandlingen af data vil afvige, hvis det opløste stof er fuldstændig blandbart med vand. For opløsningsmidler blandbare med vand kan man ved at behandle data som beskrevet under »Desorption« bestemme den mængde stof, som genfindes ved ekstraktion med opløsningsmiddel. Er opløsningsmidlet mindre blandbart med vand, må den genfundne mængde bestemmes.

Beregning af massebalancen MB for adsorption: leddet ($m_E$) antages at svare til den samlede masse prøvestof ekstraheret af jorden og fra prøveglassets overflade med organisk opløsningsmiddel:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \qquad (10)$$

hvor:

MB = massebalance ( %)

$m_E$ = samlet masse prøvestof ekstraheret fra jord og prøveglassets vægge i to trin (μg)

$C_0$ = initial massekoncentration af prøveopløsning i berøring med jorden (ug $cm^{-3}$)

$V_{rec}$ = rumfang supernatant, som er opsamlet efter indtræden af adsorptionsligevægt ($cm^{-3}$).

2.2. DESORPTION

Desorptionen (D) defineres som den procentdel af den tidligere adsorberede stofmængde, som desorberes under forsøgsbetingelserne:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

hvor:

$D_{t_i}$ = desorptionsprocent til tidspunktet $t_i$ ( %)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof desorberet fra jorden til tiden $t_i$ (µg)

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden ved adsorptionsligevægt (µg).

Udførlige oplysninger om, hvordan desorptionsprocenten $D_t^i$ beregnes ved brug af den parallelle og sekventielle metode, er givet i tillæg 5.

Den tilsyneladende desorptionskoefficient ($K_{des}$) er forholdet mellem indholdet af resterende stof i jordfasen og massekoncentrationen af desorberet stof i den vandige opløsning under testbetingelserne efter indtræden af desorptionsligevægt:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3 \cdot g^{-1}) \quad (12)$$

hvor:

$K_{des}$ = desorptionskoefficient ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = samlet masse af prøvestof desorberet fra jorden ved desorptionsligevægt (µg)

$V_T$ = samlet masse af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget ($cm^3$).

Vejledning tor beregning af $m_{aq}^{des}(eq)$ (eq) findes i tillæg 5 under overskriften »Desorption«.

Bemærkning:

Hvis den efterfølgende adsorptionstest blev udført med den parallelle metode, sættes rumfanget $V_T$ i ligning 12 lig $V_0$.

2.2.1. **Desorptionsisotermer**

Freundlich-ligningen for adsorptionsisotermer udtrykker sammenhængen mellem den mængde prøvestof, som stadig er absorberet på jorden, og koncentrationen af prøvestof ved desorptionsligevægt (ligning 16).

For hvert prøveglas beregnes indholdet af prøvestof, som stadig er adsorberet til jorden ved desorptionsligevægt, på følgende måde:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ defineres som:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \quad (14)$$

hvor:

$C_s^{des}(eq)$ = indhold af prøvestof, som ved desorptionsligevægt stadig er adsorberet til jorden (µg $g^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = masse af stof, som er bestemt analytisk i den vandige fase ved desorptionsligevægt (µg)

▼B

$m_{aq}^{A}$ = masse af prøvestof, som på grund af ufuldstændig volumenudskiftning er tilbage efter indtræden af adsorptionsligevægtt (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq)\cdot\left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

$V_r^F$ = rumfang opløsning, som ved desorptionsligevægt er udtaget af prøveglasset med henblik på bestemmelse af prøvestof ($cm^3$)

$V_R$ = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning ($cm^3$).

Freundlich-desorptionsligningen er vist i (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des}\cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n}(\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eller, på lineær form:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n\cdot\log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

hvor:

$K_F^{des}$ = Freundlich-desorptionskoefficient

n = regressionskonstant

$C_{aq}^{des}(eq)$ = massekoncentration af stof i vandig fase ved desorptionsligevægt (μg $cm^{-3}$).

Ligningerne 16 og 17 kan afsættes grafisk, og værdien af $K_F^{des}$ og l/n beregnes ved regressionsanalyse ved anvendelse af ligning 17.

Bemærkning:

Hvis Freundlich-adsorptions- eller desorptionseksponenten l/n er lig 1, vil Freundlich-bindingskonstanten for adsorption eller desorption ($K_F^{ads}$ og $K_F^{des}$) være lig ligevægtskonstanterne ($K_d$ og $K_{des}$) for henholdsvis adsorption og desorption, og ved afbildning af $C_s$ mod $C_{aq}$ fås en ret linje. Er eksponenterne forskellige fra 1, bliver en afbildning af $C_s$ som funktion af $C_{aq}$ ulineær, og adsorptions- og desorptionskonstanterne vil ændre sig langs isotermerne.

2.2.2. **Testrapport**

Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

a) fuldstændig identifikation af de anvendte jordprøver, med angivelse af:

b) stedsbestemmelse for lokaliteten (bredde og længde)

c) prøveindsamlingsdato

▼B

d) anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

e) dybde af prøvetagning

f) sand-/silt-/lerindhold

g) pH-værdi (i 0,01 M $CaCl_2$)

h) organisk kulstofindhold

i) indhold af organisk stof

j) kvælstofindhold

k) C/N-forhold

l) kationbytningskapacitet (mmol/kg)

m) udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

n) når det er hensigtsmæssigt, alle relevante oplysninger til fortolkning af prøvestoffets adsorption/desorption

o) henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

p) oplysninger om prøvestoffet, hvis det er hensigtsmæssigt

q) forsøgstemperaturen

r) centrifugeringsbetingelser

s) analysemetode anvendt til analyse af prøvestoffet

t) begrundelse af enhver brug af opløsningsmiddel til fremstilling af stamopløsningen af prøvestoffet

u) forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

v) data i henhold til formularbladet (tillæg 6) og grafiske fremstillinger

w) alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af testresultaterne.

3. **HENVISNINGER**

(1) Kukowski H. and Brummer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18.-20. januar 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate. Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/ Desorption Isotherm. EPA No: 71 2-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ($K_{oc}$) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), »Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils«, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), »Adsorption-Desorption Phenomena« in Interactions between herbicides and the soil, (R. . Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31-44.

(15) van Genuchten M.Th., Davidson J. M., and Wierenga P.J., (1974), »An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media«. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981), »Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis«, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), »Movement and sorption of chemicals applied to the soil«. Weeds, 13, pp. 185-190.

(18) Rhodes R.C, Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) »Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils«. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), »Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil« in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney), John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), »Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides«, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), »Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils«. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), »Persistence of herbicides in soil«. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981), »Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkyiamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption«, Pestic. Sci. 12, pp. 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977), »Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides«. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961-971.

(25) Osgerby J.M., (1973), »Process affecting herbicide action in soil«. Pestic. Sci., 4, pp. 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), »Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Boden«. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143-154.

(27) Hamaker J.W., (1975), »The interpretation of soil leaching experiments«. in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971), »Pesticide mobility in soils«. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, pp. 732-210.

(29) Hamaker J.W., (1972), »Diffusion and volatilization« in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), »Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system«. Pestic. Sci. 12, pp. 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), »Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses«, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.J., (1989), »Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability«. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). »Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils«. J. of Soil Sci., 28, pp. 340-3 50.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980), »Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils«. Pest. Sci., 11, pp. 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), »Sorption estimates for modeling«, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S. M., (1967), »Functional relationship between sorption in soil and chemical structure«. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), »An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils«. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), »Molecular structure of herbicides and their sorption by soils«. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). Theoretical and experimerital relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), »Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology«. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243-246.

(41) Bailey G. W., and White J.L., (1970), »Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil«. Residue Rev., 32, pp. 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L White and Y. Rothberg., (1968), »Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate«. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981), »Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils«. Chemosphere 10, pp. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), »Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners«. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972), »Adsorption in organic chemicals« in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, »Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils«. Weed Sci. 19; pp. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975), »Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils«. Weed Science, Vol. 23, pp. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), »Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations« in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), »Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase«, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis: biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. »Methods of Soil Analysis«, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970), »Precision in pesticide adsorption measurements«. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), »Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine«. Soil Sci., pp. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, »Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system«. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. »Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106«. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980), »Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique«. Weed Res. 21, pp. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), »Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments«, Environ.Qual., 10(3), pp. 382-3S6.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), »Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water«. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), »Sorption of organic substances by soils and sediments«. J. Environm. Sci. Health, Bl 9 (3), pp. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C, (1987), »Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons«. Chemosphere, 16(1), pp. 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A. I. (1980). »Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota« in Aquatic Toxicology (eds),G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), »A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds«. Science, Vol. 206, pp. 831-832.

(71) Hassett J.J., Bamvart W. J., Wood S.G., and Means J.C, (1981), »Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption«. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), »Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils«. Chemosphere. Vol. 10(8), pp. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), »Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité«. Revue de l'Agric. 34 (4), pp. 319-322.

(74) Muller M., Kordel W. (1996), 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere. 32(12), pp, 2493-2504.

(75) Kordel W. Kotthoff G., Muller M. (1995), »HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test«. Chemosphere 30 (7), pp. 1373-1384.

(76) Kordel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), »HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases«. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), »The Speed of Attamment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides«. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C, and Harper S.S., (1990), »The retention processes: mechanisms« in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), »Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses«, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), »Interpretation and use of sorption isotherms« in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), »Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils«. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C, (1980), »Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption«. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996). Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

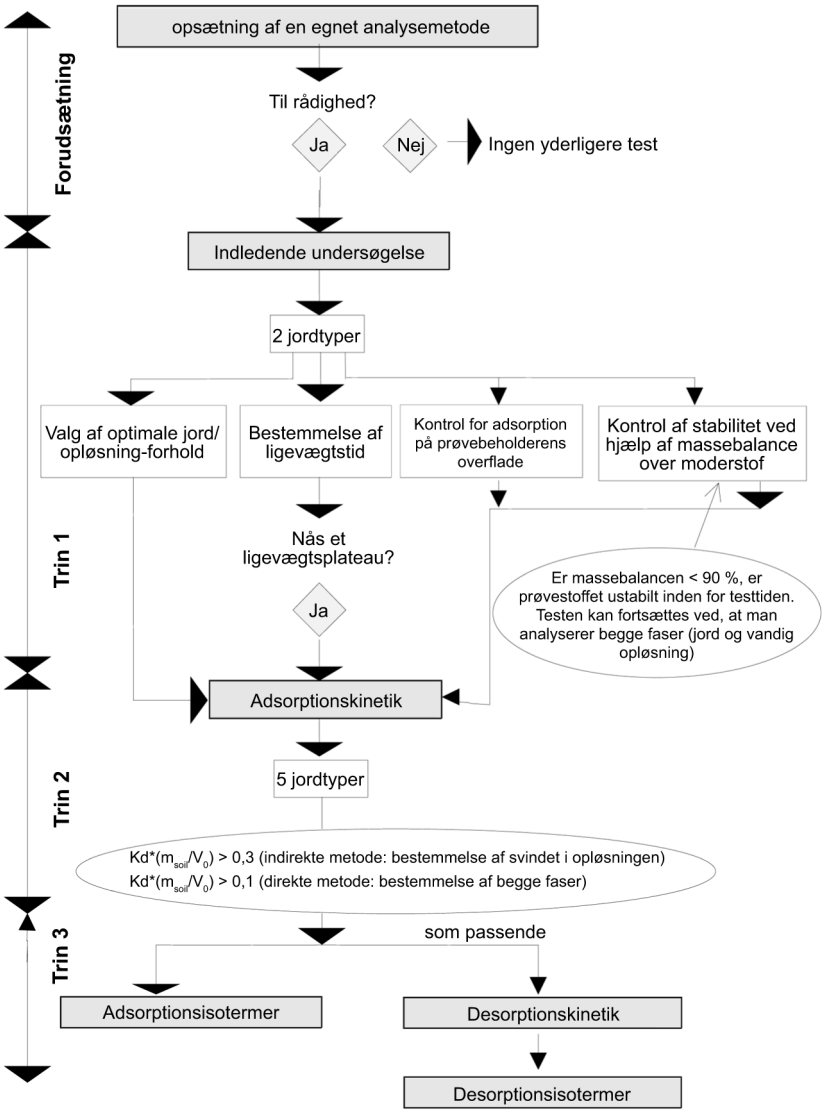
(84) Guth, J.A., (1985), »Adsorption/desorption«, in Joint international Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Arner. Proc. 26:305 (1962).

▼B

*Tillæg 1*

**Testplan**



▼B

*Tillæg 2*

**BETYDNINGEN AF ANALYSEMETODENS NØJAGTIGHED OG KONCENTRATIONSÆNDRINGER FOR ADSORPTIONSRESULTATERNES NØJAGTIGHED**

Af følgende tabel (84) ses, at når der er meget lille forskel mellem prøvestoffets begyndelsesmasse ($m_0$ =110 µg) og ligevægtsmasse ($m_{aq}^{ads}(eq)$=100 µg) i opløsningen, vil en fejl på 5 % på ligevægtskoncentrationsmålingen føre til en fejl på 50 % på beregningen af den stofmængde, som er adsorberet på jorden ($m_s^{ads}(eq)$) og på 52,4 % på beregningen af $K_d$.

Mængde jord $mj_{ord}$ = 10 g

Opløsningens rumfang $V_0$ = 100 $cm^3$

| | $m_{aq}^{ads}(eq)$(µg) | $C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg $cm^{-3}$) | R | $m_s^{ads}(eq)$∗ (µg) | $C_s^{ads}(eq)$∗ (µg $g^{-1}$) | R‡ | $K_d$* | R‡ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **FOR A = 9 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg eller $C_0$ = 1,100 µg/cm3 | 100 | 1,000 | sand værdi | 10 | 1,00 | sand værdi | 1 | |
| | 101 | 1,010 | 1 % | 9 | 0,90 | 10 % | 0,891 | 10,9 % |
| | 105 | 1,050 | 5 % | 5 | 0,50 | 50 % | 0,476 | 52,4 % |
| | 109 | 1,090 | 9 % | 1 | 0,10 | 90 % | 0,092 | 90,8 % |
| | **FOR A = 55 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg eller $C_0$ = 1,100 µg/cm3 | 50,0 | 0,500 | sand værdi | 60,0 | 6,00 | sand værdi | 12,00 | |
| | 50,5 | 0,505 | 1 % | 59,5 | 5,95 | 0,8 % | 11,78 | 1,8 % |
| | 52,5 | 0,525 | 5 % | 57,5 | 5,75 | 4,0 % | 10,95 | 8,8 % |
| | 55,0 | 0,550 | 10 % | 55,0 | 5,50 | 8,3 % | 10,00 | 16,7 % |
| | **FOR A = 99 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg eller $C_0$ = 1,100 µg/cm3 | 1,100 | 0,011 | sand værdi | 108,9 | 10,89 | sand værdi | 990 | |
| | 1,111 | 0,01111 | 1 % | 108,889 | 10,8889 | 0,01 % | 980 | 1,0 % |
| | 1,155 | 0,01155 | 5 % | 108,845 | 10,8845 | 0,05 % | 942 | 4,8 % |
| | 1,21 | 0,0121 | 10 % | 108,790 | 10,8790 | 0,10 % | 899 | 9,2 % |

Hvor:

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq)$, $C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}}$ . $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof i vandfasen ved ligevægt, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = indhold af prøvestof i jordfasen ved ligevægt, µg $g^{-1}$

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massekoncentration af prøvestoffet i vandig fase ved ligevægt, µg cm-3

R = analysefejl på bestemmelse af $m_{aq}^{ads}(eq)$

R‡ = beregnet fejl som følge af analysefejl R.

▼B

*Tillæg 3*

## TEKNIKKER TIL SKØNSMÆSSIG BEREGNING AF $K_d$

1. Ved hjælp af teknikker til skønsmæssig beregning kan størrelsen af $K_d$ forudsiges på grundlag af korrelationer med f.eks. værdier af $P_{ow}$ (12)(39)-(63-68), vandopløselighedsdata (12)(19)(21)(39)(68-73) eller polaritetsdata afledt ved brug af omvendt fase HPLC (74-76). Som vist i tabel 1 og 2 beregnes $K_{oc}$ eller $K_{om}$ og dermed indirekte $K_d$ af ligningerne:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} (cm^3 g^{-1})$$

2. Princippet om disse korrelationer hviler på to forudsætninger: (1) et stofs adsorption er hovedsagelig bestemt af jordens organiske stofindhold, og (2) de indgående vekselvirkninger er hovedsagelig af ikke-polær art. For disse korrelationer gælder følgelig: (1) de gælder ikke eller kun i nogen udstrækning for polære stoffer, og (2) de gælder ikkeved meget lille organisk stofindhold i jorden (12). Desuden gælder, at skønt der er fundet tilfredsstillende korrelation mellem $P_{ow}$ og adsorptionen (19), kan det samme ikke siges om forholdet mellem vandopløselighed og adsorptionsgrad (19)(21); undersøgelser heraf har hidtil givet meget modstridende resultater.

3. Nogle eksempler på korrelationen mellem adsorptionskoefficient og oktanol-vand fordelingskoefficient samt vandopløselighed er givet henholdsvis i tabel 1 og 2.

*Tabel 1*

**Eksempler på korrelation mellem adsorptionsfordelingskoefficienten og oktanol-vand fordelingskoefficienten; flere eksempler er givet i (12) og (68)**

| Stoffer | Korrelation | Forfatter |
|---|---|---|
| Substituerede urinstoffer | log $K_{om}$ = 0,69 + 0,52 log $P_{ow}$ | Briggs (1981) (39) |
| Aromatiske klorerede | log $K_{oc}$ = - 0,779 + 0,904 log $P_{ow}$ | Chiou et al. (198 3) (65) |
| Forskellige pesticider | log $K_{om}$ = 4,4 + 0,72 log $P_{ow}$ | Gerstl og Mingelgrin (1984) (66) |
| Aromatiske carbonhydrider | log $K_{oc}$ = - 2,53 + 1,15 log $P_{ow}$. | Vowles og Mantoura (1987) (67) |

*Tabel 2*

**Eksempler på korrelationen mellem adsorptionsfordelingskoefficient og vandopløselighed; flere eksempler er givet i (68) og (69)**

| Stoffer | Korrelation | Forfatter |
|---|---|---|
| Forskellige pesticider | log $K_{om}$ = 3,8 - 0,561 log $S_w$ | Gerstl og Mingelgrin (1984) (66) |
| Alifatiske og aromatiske klorerede forbindelser | log $K_{om}$ = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) log $S_w$ | Chiou et al. (1979) (70) |
| a-naphtol | log $K_{oc}$ = 4,273 - 0,686 log $S_w$ | Hasset et al. (1981) (71) |
| Cykliske, alifatiske og aromatiske stoffer | log $K_{oc}$ = - 1,405 - 0,921 log $S_w$ - 0,00953 (mp-25) | Karickhoff (1981) (72) |
| Forskellige forbindelser | log $K_{om}$ = 2,75 - 0,45 log *Sw* | Moreale van Blade (1982) (73) |

▼B

*Tillæg 4*

**BEREGNINGER TIL FASTLÆGGELSE AF CENTRIFUGERINGS-BETINGELSER**

1. Centrifugeringstiden er givet ved følgende formel, idet partiklerne forudsættes at være kugleformede:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln(R_b/R_t) \qquad (1)$$

For enkelhedens skyld er alle parametre angivet i ikke-SI-enheder (g, cm)

hvor

$\omega$ = rotationshastighed (=2 π rpm/60), rad $s^{-1}$

rp = omdrejninger pr. minut

$\eta$ = opløsningens viskositet, g s-1[1] $cm^{-1}$

$r_p$ = partikelradius, cm

$\rho_s$ = massefylde af jord, g $cm^{-3}$

$\rho_{aq}$ = massefylde af opløsning, g $cm^{-3}$

$R_t$ = afstand fra centrum af centrifugerotoren til overfladen af opløsningen i centrifugeglasset, cm

$R_b$ = afstand fra centrum af centrifugerotoren til bunden i centrifugeglasset, cm

$R_b$-Rt = længde af jord/opløsning-blandingen i centrifugeglasset, cm.

I praksis fordobler man sædvanligvis de beregnede tider for at sikre fuldstændig separation.

2. Ligning 1 kan forenkles yderligere, hvis opløsningens viskositet ($\eta$) og massefylde ($\rho_{aq}$) sættes lig viskositeten og massefylden afvand ved 25 °C, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}$ $cm^{-1}$ og $\rho_{aq} = 1{,}0$ g $cm^{-3}$.

Centrifugeringstiden er da givet ved ligning 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 . r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Af ligning 2 ses, at to parametre er vigtige ved fastlæggelse af centrifugeringsbetingelseme, nemlig tid (t) og hastighed (rpm), når man vil udskille partikler med en given størrelse (i vort tilfælde radius 0,1 μm): (1) jordens massefylde og (2) længden af blandingen i centrifugeglasset ($R_b$-$R_t$), dvs. den distance, som en jordpartikel tilbagelægger fra overfladen af opløsningen til glassets bund; for et givet rumfang er det klart, at længden af blandingen i røret bestemmes af kvadratet på rørets radius.

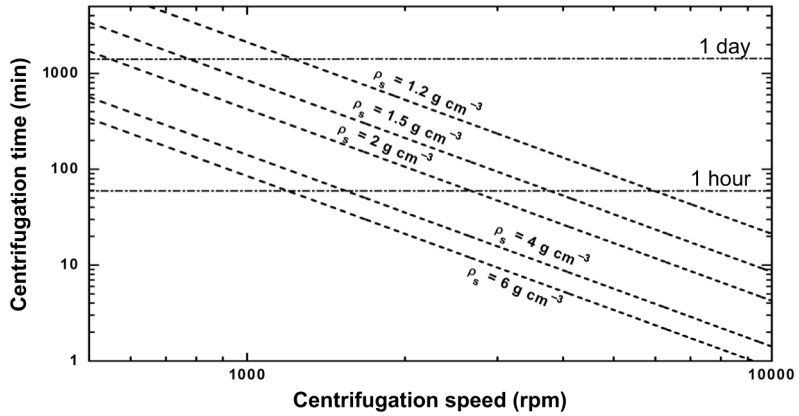
4. Figur 1 viser sammenhængen mellem centrifugeringstiden (t) og centrifugeringshastigheden (rpm) for forskellige jordmassefylder ($p_s$ (Figur la) og forskellige længder af blandingen i centrifugeglassene (Figur 2a). Af figur la ses betydningen af jordens massefylde tydeligt; for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca.240 min for jord med massefylde 1,2 g cm men kun 50 min., når massefylden er 2,0 g cm Tilsvarende ses af figur 1b, at for en typisk centrifugeringshastighed på 3000 rpm er centrifugeringstiden ca. 50 min for en længde af blandingen på 10 cm men kun 7 min for en længde på 1 cm. Det er imidlertid vigtigt at finde et optimalt forhold mellem den centrifugering, som kræver mindst mulig længde, og den. som gør det let for eksperimentatoren at adskille faserne efter centrifugering.

▼B

5. Ved fastlæggelse af forsøgsbetingelserne med henblik på adskillelse af fast og flydende fase er det desuden vigtigt at tage hensyn til eventuel tilstedeværelse af en tredje »pseudo«-fase, kolloiderne. Disse partikler, der er under 0,2 μm, kan i væsentlig grad påvirke hele absorptionsmekanismen for et stof i en jordsuspension. Når der centrifugeres som ovenfor beskrevet, forbliver kolloiderne i den vandige fase og bliver analyseret sammen med den vandige fase. Derfor går oplysningerne om deres indflydelse tabt.

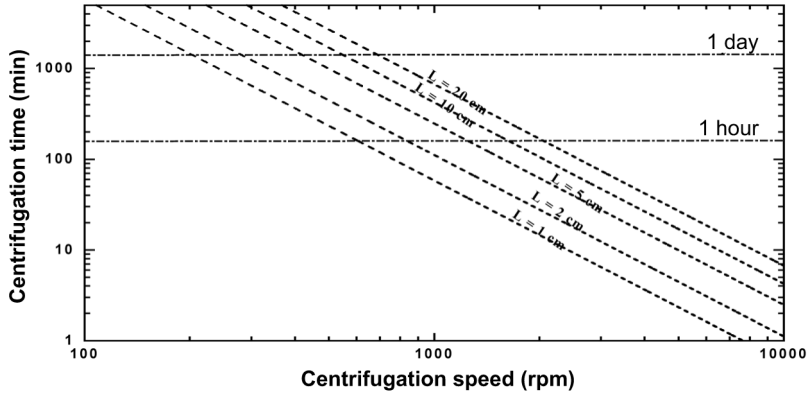
   Hvis det laboratorium, som forestår undersøgelsen, har faciliteter til ultracentrifugering eller ultrafiltrering, kan adsorption/desorption af et stof i jord undersøges mere tilbundsgående, herunder stoffets adsorption på kolloiderne, I så tilfælde bør der anvendes ultracentrifugering ved 60 000 rpm eller ultrafiltrering med en filterporøsitet på 100 000 Dalton til at adskille de tre faser jord, kolloider og opløsning. Den forsøgsprotokol bør desuden ændres tilsvarende, således at alle tre faser analyseres for stoffet.

**Figur 1a.**




Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centrifugeringshastighed (rpm) ved forskellige jordmas-sefylder ($p_s$). $R_t$ = 10 cm, $R_b$-Rt = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s$^{-1}$ cm$^{-1}$ og $\rho_{aq}$ = 1,0 g cm$^{-3}$ ved 25 °C.

**Fig, 1b.**



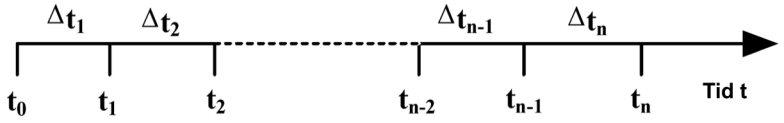

Sammenhængen mellem centrifugeringstid (t) og centifugeringshastighed (rpm) for forskellige længder af blandingen i centrifugeglasset ($R_b$-$R_t$) = L; Rs = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s$^{-1}$ cm$^{-1}$, $\rho_{aq}$ = 1,0 g cm$^{-3}$ ved 25 °C og $\rho_s$ = 2,0 g cm$^{-3}$.

▼B

*Tillæg 5*

**BEREGNING AF ADSORPTION A ( %) OG DESORPTION D ( %)**

Tidsplanen for proceduren er følgende:




Ved alle beregninger er forudsat, at prøvestoffet er stabilt og ikke adsorberes nævneværdigt til beholderens vægge.

ADSORPTION A (A %)

a) *Den parallelle metode*

Adsorptionsprocenten beregnes for hvert prøveglas (i) ved hvert tidspunkt ($t_i$) efter ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Leddene i denne ligning kan beregnes på følgende måde:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

hvor:

$A_{t_i}$ = adsorptionsprocent ( %) til tiden $t_i$

$m_s^{ads}(t_i)$ = masse af prøvestof adsorberet til jorden på det tidspunkt $t_i$, da analysen udføres (μg);

$m_0$ = masse af prøvestof i prøveglasset ved prøvens begyndelse (μg)

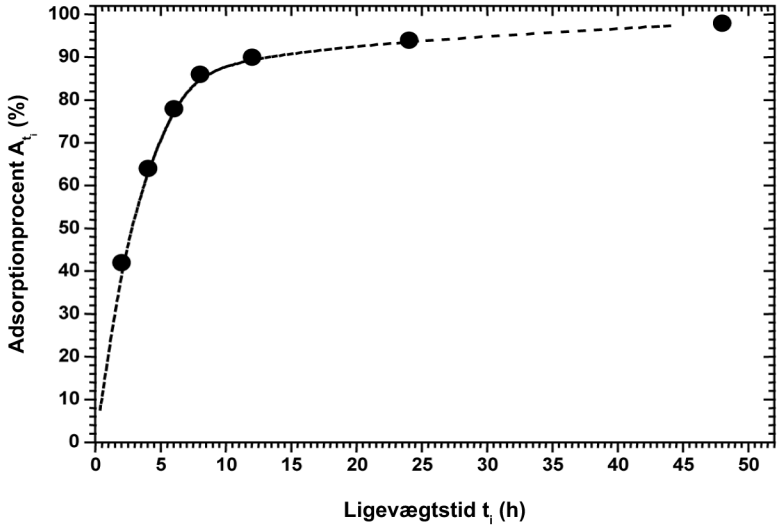
$C_0$ = initial massekoncentration afprøveopløsning i berøring med jorden (μg $cm^{-3}$)

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = massekoncentration af stof i vandig fase på det tidspunkt $t_i$, da analysen udføres (µg $cm^{-3}$); denne koncentration bestemmes ved analyse med hensyntagen til blindværdierne

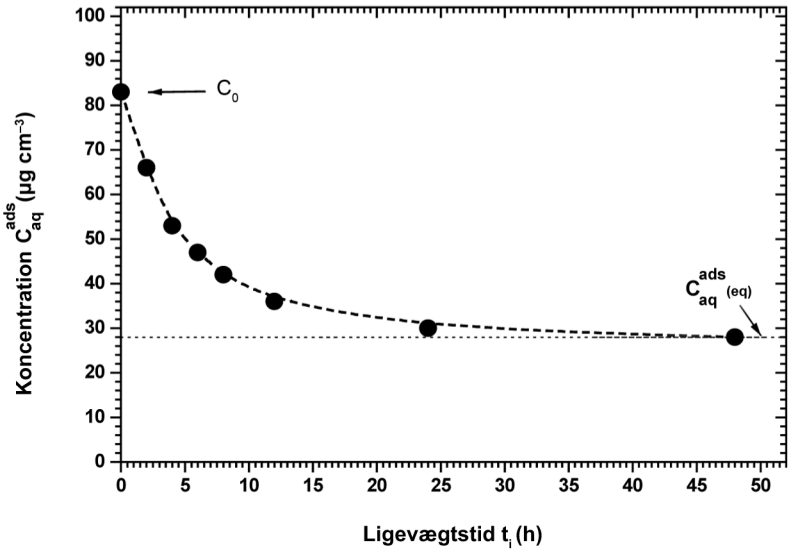
$V_0$ = initialt rumfang af prøveopløsning i kontakt med jorden ($cm^3$).

Værdierne af adsorptionsprocenten $A_{t_i}$ eller $C_{aq}^{ads}(t_i)$ afsættes på en kurve mod tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes. Eksempler på sådanne kurver er givet i hhv. figur 1 og figur 2.




**Figur 1.**

Adsorptionsligevægtskurve.




**Figur 2.**

Massekoncentration af prøvestoffet i vandfasen ($C_{aq}$) som funktion af tiden.

▼B

b) *Den sekventielle metode*

I de følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver af vandig fase til bestemte tidsintervaller.

— Inden for hvert tidsinterval beregnes mængden af stof adsorberet på jorden på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left( \frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— for det tredje tidsinterval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left( \frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left( \frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left( \frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left( \frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Adsorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $A_{\Delta t_i}$ beregnes ved følgende ligning:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

medens adsorptionsprocenten $A_{t_i}$ til tidspunktet $t_i$ er givet ved ligningen:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Adsorptionsværdierne $A_{t_i}$ eller $A_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes som funktion af tiden, og tiden til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

— Ved ligevægtstidspunktet $t_{eq}$:

— er massen af prøvestof adsorberet på jorden:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— er massen af prøvestof i opløsningen:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— og er adsorptionsprocenten ved ligevægt:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

De ovenfor anvendte parametre er defineret som følger:

| | |
|---|---|
| $m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$ | = masse af prøvestof adsorberet til jorden henholdsvis i løbet af tidsintervallerne $\Delta_{t1}$, $\Delta_{t2}$,..., $\Delta_{tn}$ (μg); |
| $m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), ..., m_n^{ads}(t_n)$ | = masse af prøvestof målt i en prøve $v_a^A$ henholdsvis til tiden $t_1$, $t_2$,$t_n$ (μg); |
| $m_s^{ads}(eq)$ | = masse af stof adsorberet på jorden ved adsorptionsligevægt (μg) |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | = masse af stof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg) |
| $v_a^A$ | = rumfang af den prøve, hvori prøvestoffet måles ($cm^3$) |
| $A_{\Delta t_i}$ | = adsorptionsprocent svarende til et tidsinterval $\Delta t_i$ (%) |
| $A_{eq}$ | = adsorptionsprocent ved adsorptionsligevægt (%). |

DESORPTION D (%)

Tidspunktet $t_0$ for start af desorptionskinetikforsøget regnes som det tidspunkt, hvor det maksimale opsamlede rumfang af prøvestofopløsningen (efter indtræden af adsorptionsligevægt) erstattes et tilsvarende rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning.

a) *Den parallelle metode*

Til tiden $t_i$ måles massen af prøvestof i den vandige fase udtaget af prøveglas i ($V_r^i$).og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left( \frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Massen af prøvestof desorberet i et tidsinterval ($\Delta t_1$) er givet ved ligningen:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorptionsprocenten beregnes:

til tidspunktet $t_i$ af ligningen:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

og i et tidsinterval ($\Delta t_1$) af ligningen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

hvor:

$D_{t_i}$ = desorptionsprocent til tidspunktet $t_i$ ( %);

$D_{\Delta t_i}$ = desorprionsprocent svarende til et tidsinterval Δti ( %)masse af prøvestof desorberet til tidspunktet $t_i$ (μg)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = masse af prøvestof desorberet til tidspunktet $t_i$ (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = masse af prøvestof desorberet af jorden i løbet af et tidsinterval $\Delta t_1$ (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = masse af prøvestof bestemt analytisk til et tidspunkt $t_i$ i et rumfang opløsning $V_r^i$, som udtages til analysen (μg)

$m_{aq}^{A}$ = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masse af prøvestof i opløsningen ved adsorptionsligevægt (μg)

$V_R$ = rumfang supernatant, som efter opnåelse af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning ($cm^3$)

$V_r^i$ = rumfang af opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof i desorptionskinetikforsøget ($cm^3$).

Værdierne af desorptionen $D_{t_i}$ eller $D_{\Delta t_i}$ (afhængigt af, hvad der er nødvendigt i undersøgelsen) afsættes mod tiden, og tidsrummet til indtræden af sorptionsligevægt bestemmes.

b) *Den sekventielle metode*

I følgende ligninger er der taget hensyn til, at adsorptionsbestemmelsen sker ved måling af prøvestoffet i små prøver ($v_a^A$) af vandig fase (den sekventielle metode i 1.9. Testens præstationer). Forudsætninger: a) det rumfang supernatant, som er fjernet fra glasset efter adsorptionskinetikforsøget er erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning ($V_R$), og b) det samlede rumfang vandig fase i kontakt med jorden ($V_T$) under desorptionskinetikforsøget forbliver uændret og er givet ved ligningen:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Til tidspunktet $t_i$:

— måles massen af prøvestof i en lille prøve ($v_a^D$), og den desorberede masse beregnes af ligningen:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— ved desorptionsligevægt er $t_i = t_{eq}$ og derfor $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— kan desorptionsprocenten $D_{t_i}$ beregnes af følgende ligning:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

I et tidsinterval ($\Delta t_1$):

beregnes mængden af stof desorberet i for hvert tidsinterval på følgende måde:

— for det første tidsinterval $\Delta t_1 = t_i - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— for det andet tidsinterval $\Delta t_1 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

og

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— for det n'te tidsinterval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$\text{og } m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Endelig beregnes desorptionsprocenten i hvert tidsinterval, $D_{\Delta t_i}$ ved hjælp af følgende ligning:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

medens desorptionsprocenten $D_{t_i}$, til tidspunktet $t_i$ er givet ved ligningen:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

hvor de ovenfor anvendte parametre er defineret således:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof desorberet henholdsvis i løbet af tidsintervallet $\Delta t_1$, $\Delta t_2$, ..., $\Delta t_n$ (µg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve henholdsvis til tidspunktet $t_1$, $t_2$, ..., $t_n$ (µg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = masse af prøvestof målt i en prøve($v_a^D$) henholdsvis til tidspunktet $t_1$, $t_2$, ..., $t_n$ (µg)

$V_T$ = samlet rumfang af vandig fase i kontakt med jorden under desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode ($cm^3$)

$m_{aq}^A$ = masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning (µg)

$$m_{aq}^A = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

$V_R$ = rumfang supernatant, som efter indtræden af adsorptionsligevægt er fjernet fra prøveglasset og erstattet af samme rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsnmg ($cm^3$)

$v_a^D$ = rumfang af prøve udtaget af prøveglas (i) til analyseformål i desorptionskinetikforsøget udført med den sekventielle metode ($cm^3$)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

*Tillæg 6*

**ADSORPTION-DESORPTION I JORD: DATARAPPORTERINGSBLADE**

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): %

Temperatur: °C

**Analysemetodens egnethed**

| | | |
|---|---|---|
| Afvejet jord | g | |
| Jord: tør masse | g | |
| Rumfang $CaCl_2$-opløsning | $cm^3$ | |
| Nominel koncentreret endelig opløsning | µg $cm^{-3}$ | |
| Analytisk bestemt koncentreret endelig opløsning | µg $cm^{-3}$ | |

Princip i anvendt analysemetode:

Kalibrering af analysemetode:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): %

Temperatur: °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

Direkte ☐

**Adsorptionstest: udtagne prøver**

| | Symbol | Enhed | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prøveglas nr. | | | | | | | | | | |
| Afvejet jord | — | g | | | | | | | | |
| Jord: tør masse | $m_{Soil}$ | g | | | | | | | | |
| Rumfang vand i afvejet jord (beregnet) | $V_{WS}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Rumfang stamopløsning | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord | $V_0$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Begyndelseskoncentration af prøveopløsning | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Masse af prøvestof ved testens begyndelse | $m_0$ | µg | | | | | | | | |

▼B

| | Symbol | Enhed | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | | Ekvilibre-ringstid | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Efter omrøring og centrifugering** | | | | | | | | | | |
| INDIREKTE METODE | | | | | | | | | | |
| Parallelle metode | | | | | | | | | | |
| Koncentration af prøvestof i vandig fase inklusive korrektion for blindværdi | $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | µg cm-$^3$ | | | | | | | | |
| Sekventielle metode | | | | | | | | | | |
| Målt masse af prøvestof i prøve $V_a$ [A] | $m_m^{ads}(t_i)$ | µg | | | | | | | | |
| DIREKTE METODE | | | | | | | | | | |
| Masse af prøvestof adsorberet på jord | $m_s^{ads}(t_i)$ | µg | | | | | | | | |
| Beregning af adsorption | | | | | | | | | | |
| Adsorption | $A_{t_i}$ | % | | | | | | | | |
| | $A_{\Delta t_i}$ | % | | | | | | | | |
| Gennemsnitsværdier | | | | | | | | | | |
| Adsorptionskoefficient | $K_d$ | $cm^3\ g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Gennemsnitsværdier | | | | | | | | | | |
| Adsorptionskoefficient | $K_{oc}$ | $cm^3\ g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Gennemsnitsværdier | | | | | | | | | | |

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): %

Temperatur: °C

**Adsorptionstest: blindprøver og kontrolprøver**

| | Symbol | Enhed | Blindprøve | | Blindprøve | | Kontrolprøve | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Glas nr. | | | | | | | | |
| Afvejet jord | | g | | | | | 0 | 0 |
| Mængde vand i afvejet jord (beregnet) | | $cm^3$ | | | | | — | — |
| Tilsat rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning | | $cm^3$ | | | | | | |
| Tilsat rumfang stamopløsning af prøvestof | | $cm^3$ | 0 | 0 | | | | |
| Samlet rumfang vandig fase (beregnet) | | $cm^3$ | | | | | — | — |

▼B

| | Symbol | Enhed | Blindprøve | | Blindprøve | | Kontrolprøve | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Begyndelseskoncentration af prøvestof i vandig fase | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |
| **Efter omrøring og centrifugering** | | | | | | | | |
| Koncentration i vandig fase | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |

Bemærkning: Tilføj flere kolonner om nødvendigt.

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h):

Temperatur:

**Massebalance**

| | Symbol | Enhed | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Prøveglas nr. | | | | | | |
| Afvejet jord | — | g | | | | |
| Jord: tør masse | $m_{soil}$ | g | | | | |
| Rumfang vand i afvejet jord (beregnet) | $V_{WS}$ | ml | | | | |
| Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord | | ml | | | | |
| Rumfang stamopløsning | | $cm^3$ | | | | |
| Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jord | $V_0$ | $cm^3$ | | | | |
| Begyndelseskoncentration af prøveopløsning | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Ekvilibreringstid | — | h | | | | |
| **Efter omrøring og centrifugering** | | | | | | |
| Koncentration af prøvestof i vandig fase ved adsorptionsligevægt inklusive blindværdikorrektion | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Ekvilibreringstid | $t_{eq}$ | h | | | | |
| Første fortynding med opløsningsmiddel | | | | | | |
| Fjernet rumfang vandig fase | $v_{rec}$ | $cm^3$ | | | | |
| Tilsat rumfang opløsningsmiddel | $\Delta V$ | $cm^3$ | | | | |
| Første ekstraktion med opløsningsmiddel | | | | | | |
| Signalstof i opløsningsmiddel | $S_{E1}$ | var. | | | | |
| Koncentreret prøvestof i opløsningsmiddel | $C_{E1}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |

▼B

| | Symbol | Enhed | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge | $m_{E1}$ | µg | | | | |

Anden fortynding med opløsningsmiddel

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Fjernet rumfang opløsningsmiddel | $\Delta V_S$ | $cm^3$ | | | | |
| Tilsat rumfang opløsningsmiddel | $\Delta V$ | $cm^3$ | | | | |

Anden ekstraktion med opløsningsmiddel

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Signalstof i opløsningsmiddelfase | $S_{E2}$ | var. | | | | |
| Koncentreret prøvestof i opløsnings-middel | $C_{E2}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Masse stof ekstraheret fra jord og beholdervægge | $m_{E2}$ | µg | | | | |
| Samlet masse prøvestof ekstraheret i to trin | $m_E$ | µg | | | | |
| Massebalance | MB | % | | | | |

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): %

Temperatur: °C

**Adsorptionsisotermer**

| | Symbol | Enhed | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prøveglas nr. | | | | | | | | | | |
| Afvejet jord | — | g | | | | | | | | |
| Jord: tør masse | E | g | | | | | | | | |
| Rumfang vand i afvejet jord (beregnet) | $V_{WS}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Rumfang 0,01 M $CaCl_2$-opløsning til ekvilibrering af jord | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Tilsat rumfang stamopløsning | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Samlet rumfang vandig fase i kontakt med jorden (beregnet) | $V_0$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Koncentration, opøsning | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Ekvilibreringstid | — | h | | | | | | | | |

▼B

| | Symbol | Enhed | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Efter omrøring og centrifugering** | | | | | | | | | | |
| Stofkoncentration, vandig fase, inklusive blindkorrektion | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Temperatur | | °C | | | | | | | | |
| Adsorptionsmasse pr. enhed jord | $C_s^{ads}(eq)$ | µg $g^{-1}$ | | | | | | | | |

Regressionsanalyse:

størrelse af $K_F^{ads}$:

størrelse af l/n:

regressionskoefficient $r^2$:

Afprøvet stof:

Afprøvet jord:

Jordens tørstofmasseindhold (105 °C, 12 h): %

Temperatur: °C

Anvendt analysemetodik: Indirekte ☐ Parallel ☐ Sekventiel ☐

**Desorptionstest**

| | | Symbol | Enhed | Tidsinterval | Tidsinterval | Tidsinterval | Tidsinterval |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Prøveglas ner. fra adsorptionstrin | | | | | | | |
| Masse af stof adsorberet til jord ved adsorptionsligevægt | | $m_s^{ads}(eq)$ | µg | | | | |
| Fjernet rumfang vandig fase, erstattet med 0,01 M $CaCl_2$ | | $V_R$ | $cm^3$ | | | | |
| Samlet rumfang vandig fase i berøring med jorden | PM | $V_0$ | $cm^3$ | | | | |
| | SM | $V_T$ | $cm^3$ | | | | |
| Masse af prøvestof, som er til overs efter indtræden af adsorptionsligevægt som følge af ufuldstændig volumenudskiftning | | $m_{aq}^{A}$ | µg | | | | |

**Desorptionskinetik**

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Målt mass stof desorberet fra jorden til tiden $t_i$ | | $m_m^{des}(t_i)$ | µg | | | | |
| Rumfang opløsning udtaget af prøveglas (i) til bestemmelse af prøvestof | PM | $V_f^i$ | $cm^3$ | | | | |
| | SM | $v_a^D$ | $cm^3$ | | | | |
| Masse stof desorberet fra jorden til tiden $t_i$ (beregnet) | | $m_{aq}^{des}(t_i)$ | µg | | | | |
| Masse stof desorberet fra jorden i tidsintervallet $\Delta t_i$ (beregnet) | | $m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ | µg | | | | |

▼B

| | Symbol | Enhed | Tidsin-terval | Tidsin-terval | Tidsin-terval | Tidsin-terval |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Desorptionsprocent** | | | | | | |
| Desorption til tiden $t_i$ | $D_{ti}$ | % | | | | |
| Desorption til tidsintervallet $\Delta t_i$ | $D_{\Delta t_i}$ | % | | | | |
| Tilsyneladende desorptionskoefficent | $K_{des}$ | | | | | |

PM: Parallelle metode.

SM: Sekventielle metode.

▼B

## C.19. BESTEMMELSE AF ADSORPTIONSKOEFFICIENTEN ($K_{oc}$) I JORD OG I KLOAKSLAM MED HPLC (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

### 1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 121 (2000).

### 1.1. INDLEDNING

Stoffers sorptionsegenskaber i jord og kloakslam kan beskrives ved parametre, som bestemmes eksperimentelt med prøvemetode C.18. En vigtig parameter er adsorptionskoefficienten, der defineres som forholdet mellem stoffets koncentration i jord/slam og stoffets koncentration i den vandige fase ved adsorptionsligevægt. Adsorptionskoefficienten normaliseret efter jordens organiske kulstofindhold. $K_{oc}$ er nyttig som indikator for et kemisk stofs bindingsevne til organisk materiale i jord og kloakslam og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Denne parameter kan bestemmes ved korrelering med vandopløseligheden og fordelingskoefficienten i n-oktanol/vand (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes HPLC til bestemmelse af adsorptionskoefficienten $K_{oc}$ i jord og i kloakslam (8). De derved beregnede værdier er mere pålidelige end dem, der bygger på QSAR-beregninger (9). Som beregningsmetode kan den ikke helt erstatte batch-ligevægtsforsøgene i prøvemetode C.18. Den beregnede $K_{oc}$-værdi kan imidlertid være nyttig ved valg af passende testparametre til adsorptions-/desorptionsundersøgelser med prøvemetode C.18 gennem beregning af $K_d$ (fordelingskoefficient) eller $K_f$ (Freundlich-adsorptionskoefficient) efter ligning 3 (jf. 1.2).

### 1.2. DEFINITIONER

$K_d$: Fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem ligevægtskoncentrationerne C af et opløst prøvestof i et tofasesystem bestående af et sorptionsmiddel (jord eller kloakslam) og en vandig fase; den er dimensionsløs, når koncentrationerne i begge faser udtrykkes på w/w basis. Angives koncentrationen i den vandige fase på vægt/volumen basis, bliver enheden ml $g^{-1}$. $K_d$ kan variere med absorptionsmidlets egenskaber og kan være koncentrationsafhængig.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} eller \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

hvor:

$C_{soil}$ = ligevægtskoncentration af prøvestof i jord (μg $g^{-1}$)

$C_{siudge}$ = ligevægtskoncentration af prøvestof i slam (μg $g^{-1}$)

$C_{aq}$ = ligevægtskoncentration af prøvestof i vandig fase (μg $g^{-1}$, μg $ml^{-1}$).

▼B

**$K_f$:** Freundlich-adsorptionskoefficienten defineres som prøvestoffets koncentration i jord eller kloakslam (x/m), når ligevægtskoncentrationen $C_{aq}$ den vandige fase er lig én; enheden er μg $g^{-1}$ adsorptionsmiddel. Størrelsen kan afhænge af adsorptionsmidlets egenskaber.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

hvor:

x/m = mængde prøvestof x (μg) adsorberet på en mængde adsorptionsmiddel m (g) ved ligevægt

l/n = Freundlich-adsorptionsisotermens hældning

$C_{aq}$ = ligevægtskoncentration af prøvestof; vandig fase (μg $ml^{-1}$)

$$\text{Ved } C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

**$K_{oc}$:** Fordelingskoefficient ($K_d$) eller Freundlich-adsorptionskoefficient ($K_f$) normaliseret efter adsorptionsmidlets organiske kulstofindhold ($f_{oc}$); denne er navnlig for uioniserede kemiske stoffer en vigtig indikator for størrelsen af adsorptionen mellem et stof og adsorptionsmidlet og kan bruges til at sammenligne forskellige kemiske stoffer. Alt efter dimensionen af $K_d$ og $K_f$ kan $K_{oc}$ være dimensionsløs eller have enheden ml $g^{-1}$eller μg $g^{-1}$organisk stof.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimensionsløs eller ml}\cdot g^{-1}\right) \text{ eller } \frac{Kf}{foc}\left(\mu g\cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Forholdet mellem $K_{oc}$ og $K_d$ er ikke altid lineært, således kan $K_{oc}$-værdierne variere fra jordtype til jordtype, dog med langt mindre variabilitet end $K_d$ eller $K_f$.

Adsorptionskoefficienten ($K_{oc}$ afledes af kapacitetsfaktoren (k') ved hjælp af en kalibreringskurve over log k' som funktion af $log_{oc}$ for de valgte referencestoffer.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

hvor:

$t_R$: = HPLC-retentionstiden for prøve- og referencestof (minutter)

$t_0$: = HPLC-dødtid (minutter) (se 1.8.2).

**$P_{ow}$**: Oktanol-vand-fordelingskoefficienten defineres som forholdet mellem koncentrationerne af opløst stof i n-oktanol og vand; den er dimensionsløs.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENCESTOFFER

Før metoden anvendes, bør man kende strukturformel, renhed og eventuel dissociationskonstant. Det er nyttigt at kende opløselighed i vand og organiske opløsningsmidler, oktanol-vand-fordelingskoefficient og hydrolyseegenskaber.

▼B

For at korrelere de målte HPLC-retentionsdata for et prøvestof med dets adsorptionskoefficient $K_{oc}$ må der opstilles en kalibreringskurve over log $K_{oc}$ som funktion af log k'. Der kræves mindst seks referencepunkter, heraf mindst ét over og ét under den forventede værdi for prøvestoffet. Metodens nøjagtighed kan forbedres væsentligt ved at anvende referencestoffer, som er strukturmæssigt beslægtet med prøvestoffet. Foreligger sådanne data ikke, er det op til brugeren at vælge passende kalibreringsstoffer. I så fald bør der vælges et mere generelt sæt strukturmæssigt forskelligartede stoffer. De stoffer og $K_{oc}$-værdier, som kan anvendes, er i tillægget angivet i tabel 1 for kloakslam og tabel 3 for jord. Valg af andre kalibreringsstoffer bør begrundes.

1.4. PRØVEMETODENS PRINCIP

Der udføres HPLC på analysekolonner pakket med en gængs cyanopropyl-faststoffase med både lipofile og polære grupper. Der anvendes en moderat polær stationær fase baseret på silicamatrix:

| — O — Si | — $CH_2$ — $CH_2$ — $CH_2$ | — CN |
|---|---|---|
| silica | ikke polært fyldstof | polær gruppe |

Prøvemetodens princip svarer til prøvemetode A.8 (fordelingskoefficient, HPLC-metode). Når prøvestoffet føres gennem kolonnen sammen med den mobile fase, reagerer prøvestoffet med den stationære fase. Prøvestoffets fordeling mellem mobil og stationær fase bevirker, at det bliver forsinket. Den stationære fases dobbelte sammensætning med både polære og upolære bindingssteder giver mulighed for interaktion med de polære og ikke-polære grupper i et molekyle på samme måde som det er tilfældet for et organisk stof i en grundsubstans af jord eller kloakslam. Derved er det muligt at fastlægge forholdet mellem retentionstiden på søjlen og adsorptionskoefficienten på organisk materiale.

pH har væsentlig indflydelse på sorptionsegenskaberne, navnlig af polære stoffer. I landbrugsjord og i tanke i spildevandsbehandlingsanlæg ligger pH normalt mellem 5,5 og 7,5. For ioniserbare stoffer bør der udføres to forsøg med både den ioniserede og den ikke-ioniserede form i passende bufferopløsninger, dog kun når mindst 10 % af prøvestoffet er dissocieret ved pH mellem 5,5 og 7,5.

Da vurderingen alene bygger på forholdet mellem retentionen på HPLC-kolonnen og adsorptionskoefficienten, er en kvantitativ analysemetode unødvendig, og kun retentionstiden behøver bestemmes. Hvis man råder over et egnet sæt referencestoffer og kan anvende standardiserede forsøgsbetingelser, er dette en hurtig og effektiv metode til at få et skøn over adsorptionskoefficienten $K_{oc}$.

1.5. PRØVENS ANVENDELIGHED

HPLC-metoden kan anvendes på kemiske stoffer (mærkede eller umærkede), til hvilke der findes et egnet detektionssystem (f.eks. spektrofotometer, strålingsdetektor), og som er tilstrækkeligt stabile inden for forsøgsvarigheden. Den kan især være nyttig for kemiske stoffer, som er vanskelige at undersøge i andre eksperimentelle systemer (f.eks. stoffer, som er flygtige, eller hvis vandopløselighed er for ringe til at give målelige koncentrationer, og stoffer med høj affinitet til inkuberingssystemernes overflade). Metoden er anvendelig til blandinger, som giver dårligt adskilte elueringsbånd. I så fald bør øvre og nedre grænse for log $K_{oc}$-værdierne af stofferne i testblandingen angives.

▼B

Urenheder kan undertiden vanskeliggøre fortolkningen af HPLC-resultater, men er dog af underordnet betydning, når blot prøvestoffet kan identificeres sikkert ad analytisk vej og kan adskilles fra urenhederne.

Metoden er valideret for stofferne i tabel 1 i tillægget og er endvidere anvendt på en række andre kemiske stoffer i følgende grupper:

— aromatiske aminer (f.eks. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naphthylamin)

— aromatiske carboxylsyreestere (f.eks. benzoesyremethylester, 3,5-dinitrobenzoesyreethylester)

— aromatiske carbonhydrider (f.eks. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen)

— aryloxyphenoxypropionsyreestere (f.eks. diclofopmethyl, fenoxapropethyl, fenoxaprop-P-ethyl)

— benzimidazol- og imidazol-fungicider (f.eks. carbendazim. fuberidazol, triazoxid)

— carboxylsyreamider (f.eks. 2-chlorbenzamid, N.N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid)

— chlorerede carbonhydrider (f.eks. endosulfan, DDT. hexachlorbenzen, quintozen, 1.2,3-trichlorbenzen)

— insekticider af typen organiske fosforforbindelser (f.eks. azinphosmethyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos. sulprofos, triazophos)

— phenoler (f.eks. phenol, 2-nitrophenol. 4-nitrophenol, pentachlorphenol, 2.4.6-trichlorphenol. 1-naphthol)

— derivater af phenylurinstof (f.eks. isoproturon. monolinuron. pencycuron)

— pigmentfarvestoffer (f.eks. Acid Yellow 219. Basic Blue 41, Direct Red SI)

— polyaromatiske carbonhydrider (f.eks. acenaphthen, naphthalen)

— 1,3,5-triazin-herbicider (f.eks. prometryn, propazin, simazin, terbutryn)

— triazolderivater (f.eks. tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoden er ikke anvendelig til stoffer, som reagerer enten med eluenten eller den stationære fase. Den er ligeledes ikke anvendelig til stoffer, som udviser specifik interaktion med uorganiske komponenter (f.eks. kompleksdannelse med lermineraler). Metoden virker ikke nødvendigvis på overfladeaktive stoffer, uorganiske stoffer og middelstærke til stærke organiske syrer og baser. Log $K_{oc}$-værdier mellem 1,5 og 5,0 kan bestemmes. Til bestemmelse af ioniserbare stoffer må anvendes en bufret mobil fase, men der må tages forholdsregler til undgåelse af udfældning af bufferkomponenter eller prøvestof.

▼B

1.6. KVALITETSKRITERIER

1.6.1. **Nøjagtighed**

Normalt kan adsorptionskoefficienten af et prøvestof bestemmes inden for +/- 0,5 logaritmeenhed af den tilsvarende værdi bestemt ved batch-ligevægtsmetoden (se tabel 1 i tillægget). Bedre nøjagtighed kan opnås, hvis de anvendte referencestoffer er strukturelt beslægtet med prøvestoffet.

1.6.2. **Repeterbarhed**

Bestemmelserne skal foretages mindst som dobbeltbestemmelser. Log $K_{oc}$-værdier baseret på enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed indbyrdes.

1.6.3. **Reproducerbarhed**

De hidtidige erfaringer med anvendelsen af metoden underbygger dens validitet, En undersøgelse af HPLC-metoden på 48 stoffer (hovedsagelig pesticider), for hvilke der forelå pålidelige data vedrørende $K_{oc}$ i jord, resulterede i en korrelationskoefficient på R = 0,95 (10) (l1).

Der er gennemført en sammenlignende laboratorieundersøgelse med 11 deltagende laboratorier med henblik på at forbedre og validere metoden (12). Resultaterne er gengivet i tabel 2 i tillægget.

1.7. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.7.1. **Indledende skøn over adsorptionskoefficienten**

Oktanol-vand fordelingskoefficienten $P_{ow}$ (= $K_{ow}$) og, i nogen udstrækning, vandopløseligheden kan — navnlig for uioniserede stoffer — benyttes som indikatorer for adsorptionsgraden og således bruges til indledende afgrænsning af området. Der er udgivet en række nyttige korrelationer for forskellige grupper af kemiske stoffer (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2. **Apparatur**

Der anvendes en væskekromatograf forsynet med en impulsfri pumpe og en egnet detektor. Det anbefales at bruge en injektionsventil med injektionssløjfe. Der anvendes gængse kemisk bundne cyanopropyl-harpikser på silicabasis (f.eks. Hypersil og Zorbax CN). En forkolonne af samme materiale kan placeres mellem injektions-system og analysekolonne. Kolonner fra forskellige leverandører kan variere betydeligt i adskillelsesevne. Vejledende skal man opnå følgende kapacitetsfaktorer k'; log k' > 0,0 for log $K_{oc}$ = 3,0 og log k' > 0,4 for log $K_{oc}$ = 2,0 ved anvendelse af en mobil fase bestående af methanol/vand 55/45 %.

1.7.3. **Mobile faser**

Der er afprøvet forskellige mobile faser, og følgende to anbefales:

— methanol/vand (55/45 % v/v)

— methanol/0,01 M citratbuffer pH 6,0 (55/45 % v/v).

▼B

Til fremstilling af elueringsvæsken anvendes methanol af HPLC-kvalitet og destilleret vand eller citratbuffer. Blandingen afgasses før brug. Elueringen skal være isokratisk (dvs. af ensartet styrke). Er methanol/vand-blandinger ikke egnede, kan andre blandinger af organiske opløsningsmidler og vand anvendes, f.eks. ethanol/vand eller acetonitril/vand. For ioniserbare stoffer anbefales, at pH stabiliseres med bufferopløsning. Der må træffes foranstaltninger til at undgå saltudfældning og tæring af kolonnen, som kan forekomme ved visse blandinger af organisk fase og buffer.

Der må ikke anvendes additiver som f.eks. ionparreagenser, da de kan påvirke sorptionsegenskaberne af den stationære fase. Sådanne ændringer af den stationære fase kan være irreversible. Af denne grund er det ubetinget nødvendigt, at eventuelle forsøg med additiver udføres på separate kolonner.

1.7.4. **Opløste stoffer**

Prøve- og referencestoffer opløses i den mobile fase.

1.8. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.8.1. **Prøvningsbetingelser**

Temperaturen bør registreres under af målingerne. Det anbefales stærkt, at kolonnerummet er temperaturreguleret for at sikre konstante betingelser under kalibrerings- og overslagsforsøg og måling af prøvestoffet.

1.8.2. **Bestemmelse af dødtid $t_0$**

Til bestemmelse af dødtiden $t_0$ kan anvendes to forskellige metoder (se også 1.2).

1.8.2.1. *Bestemmelse af dødtiden $t_0$ ved hjælp af en homolog serie*

Denne fremgangsmåde har vist sig give pålidelige og ensartede $t_0$-værdier. Nærmere enkeltheder herom kan findes i prøvemetode A.8: Fordelingskoefficient (n-oktanol/vand), HPLC-metode.

1.8.2.2. *Bestemmelse af dødtid $t_0$ ved hjælp af inaktive stoffer, som ikke tilbageholdes af kolonnen*

Teknikken bygger på, at der indsprøjtes en opløsning af formamid, urinstof eller natriumnitrat. Bestemmelserne skal udføres mindst som dobbeltbestemmelser.

1.8.3. **Bestemmelse af retentionstider $t_R$**

Referencestoffer vælges som beskrevet i 1.3. Til bestemmelse af disse stoffers retentionstid kan de indsprøjtes som en blandet standard, forudsat at det er godtgjort, at retentionstiden for den enkelte referencestandard er upåvirket af tilstedeværelsen af de andre referencestandarder. Kalibrering skal ske med regelmæssige intervaller mindst to gange dagligt for at tage højde for eventuelle uventede ændringer i kolonnens præstationer. Det bedste er at udføre kalibreringsindsprøjtningerne før og efter indsprøjtning af prøvestoffet for at bekræfte, at retentionstiderne er uændrede. Prøvestofferne indsprøjtes separat i mindst mulig mængde (undgå overbelastning af kolonnen), og deres retentionstider bestemmes.

▼B

For at gøre målingerne mere pålidelige bør de udføres mindst som dobbeltbestemmelser. Log $K_{oc}$-værdier afledt af enkeltmålinger bør højst afvige 0,25 logaritmeenhed fra hinanden.

1.8.4. **Bedømmelse**

Kapacitetsfaktorerne k' beregnes af dødtiden $t_0$ og retentionstiderne $t_R$ for de valgte referencestoffer efter ligning 4 (se 1.2). Log k'-værdierne for referencestofferne afbildes derefter mod de tilhørende log $K_{oc}$-værdier fra batchligevægtsforsøgene, som er givet i tabel 1 og 3 i tillægget. Ved hjælp af denne kurve anvendes log k'-værdien for et prøvestof derefter til beregning af dets $K_{oc}$-værdi. Viser de faktiske resultater, at log $K_{oc}$ for prøvestoffet er uden for kalibreringsområdet, bør forsøget gentages med et andet, mere velegnet referencestof.

2. **DATA OG RAPPORTERING**

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

— identitet og renhed af prøve- og referencestof, samt $pK_a$-værdi hvis relevant

— beskrivelse af apparatur og forsøgsbetingelser, f.eks. type og dimension af analysekolonne (og forkolonne), detektionsmåde, mobil fase (forholdet mellem komponenterne, samt pH), temperaturområde under målingerne

— dødtiden og metoden anvendt til bestemmelse heraf

— mængdeprøve- og referencestof, som indføres i kolonnen

— retentionstiderne for de referencestoffer, der anvendes til kalibrering

— enkeltheder vedrørende den tilnærmede regressionslinje (log k' mod log Koc) og grafisk fremstilling af regressionslinjen

— gennemsnitlig retention og beregnet d log $K_{oc}$-værdi for prøvestoffet

— kromatogrammer.

**HENVISNINGER**

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N.A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ($K_{oc}$) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 1 7, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V.H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils, Chemosphere, 10, pp. 833-846.

(8) W. Kordel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kordel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kordel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kordel, W. Klein (1991) Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kordel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test, Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

*Tillæg*

*Tabel 1*

**Sammenligning af $K_{oc}$-værdier for jordarter og kloakslam, samt værdier beregnet ved HPLC-screeningsmetoden** (1) (2)

| Stof | CAS nr. | kloakslam | Log $K_{oc}$ ved HPLC | Δ | Log $K_{oc}$ for jordtyper | Log $K_{oc}$ ved HPLC | Δ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,66 | 2,14 | 0,48 | 1,81 | 2,20 | 0,39 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,43 | 2,96 | 0,53 | 2,59 | 2,89 | 0,30 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,75 | 3,58 | 0,17 | 3,31 | 3,40 | 0,09 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,46 | 2,21 | 0,75 | 1,99 | 2,26 | 0,27 |
| Phenanthren | 85-01-8 | 4,35 | 3,72 | 0,63 | 4,09 | 3,52 | 0,57 |
| Benzoesyrephenylester | 93-99-2 | 3,26 | 3,03 | 0,23 | 2,87 | 2,94 | 0,07 |
| Benzamid | 55-21-0 | 1,60 | 1,00 | 0,60 | 1,26 | 1,25 | 0,01 |
| 4-Nitrobenzamid | 619-80-7 | 1,52 | 1,49 | 0,03 | 1,93 | 1,66 | 0,27 |
| Acetanilid | 103-84-4 | 1,52 | 1,53 | 0,01 | 1,26 | 1,69 | 0,08 |
| Anilin | 62-53-3 | 1,74 | 1,47 | 0,27 | 2,07 | 1,64 | 0,43 |
| 2,5-Dichloroanilin | 95-82-9 | 2,45 | 2,59 | 0,14 | 2,55 | 2,58 | 0,03 |

(1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

*Tabel 2*

**Resultater af det laboratoriesammenlignende forsøg (11 deltagende laboratorier), som er gennemført med henblik på at forbedre og validere HPLC-metoden** (1)

| Stof | CAS nr. | Log $K_{oc}$ | $K_{oc}$ | Log $K_{oc}$ |
|---|---|---|---|---|
| | | (OECD 106) | (HPLC metode) | |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 78 ± 16 | 1,89 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,99 | 100 ± 8 | 2,00 |
| Triapenthenol | 77608-88-3 | 2,37 | 292 ± 58 | 2,47 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 465 ± 62 | 2,67 |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,31 | 2 062 + 648 | 3,31 |

(1) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere. 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

*Tabel 3*

**Anbefalede referencestoffer til HPLC-screeningsmetoden baseret på jordadsorptionsdata**

| Referencestof | CAS nr. | Gennemsnitlige log $K_{oc}$-værdier fra batchligevægt | Nummer på $K_{oc}$-data | Log S.D. | Kilde |
|---|---|---|---|---|---|
| Acetanilid | 103-84-4 | 1,25 | 4 | 0,48 | (a) |
| Phenol | 108-95-2 | 1,32 | 4 | 0,70 | (a) |
| 2-Nitrobenzamid | 610-15-1 | 1,45 | 3 | 0,90 | (b) |
| N.N-dimethylbenzamid | 611-74-5 | 1,52 | 2 | 0,45 | (a) |
| 4-Methylbenzamid | 619-55-6 | 1,78 | 3 | 1,76 | (a) |
| Methylbenzoat | 93-58-3 | 1,80 | 4 | 1,08 | (a) |
| Atrazin | 1912-24-9 | 1,81 | 3 | 1,08 | (C) |
| Isoproturon | 34123-59-6 | 1,86 | 5 | 1,53 | (C) |
| 3-Nitrobenzamid | 645-09-0 | 1,95 | 3 | 1,31 | (b) |
| Anilin | 62-53-3 | 2,07 | 4 | 1,73 | (a) |
| 3,5-Dinitrobenzamid | 121-81-3 | 2,31 | 3 | 1,27 | (b) |
| Carbendazim | 10605-21-7 | 2,35 | 3 | 1,37 | (C) |
| Triadimenol | 55219-65-3 | 2,40 | 3 | 1,85 | (C) |
| Triazoxid | 72459-58-6 | 2,44 | 3 | 1,66 | (C) |
| Triazophos | 24017-47-8 | 2,55 | 3 | 1,78 | (C) |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 3 | 1,97 | (C) |
| Naphthalen | 91-20-3 | 2,75 | 4 | 2,20 | (a) |
| Endosulfan-diol | 2157-19-9 | 3,02 | 5 | 2,29 | (C) |
| Methiocarb | 2032-65-7 | 3,10 | 4 | 2,39 | (C) |
| Acid Yellow 219 | 63405-85-6 | 3,16 | 4 | 2,83 | (a) |
| 1,2,3-Trichlorbenzen | 87-61-6 | 3,16 | 4 | 1,40 | (a) |
| γ-HCH | 58-89-9 | 3,23 | 5 | 2,94 | (a) |
| Fenthion | 55-38-9 | 3,31 | 3 | 2,49 | (C) |
| Direct Red 81 | 2610-11-9 | 3,43 | 4 | 2,68 | (a) |
| Pyrazophos | 13457-18-6 | 3,65 | 3 | 2,70 | (C) |
| α-Endosulfan | 959-98-8 | 4,09 | 5 | 3,74 | (C) |
| Diclofop-methyl | 51338-27-3 | 4,20 | 3 | 3,77 | (C) |
| Phenanthren | 8 5-01-8 | 4,09 | 4 | 3,83 | (a) |
| Basic Blue 4] (mix) | 26850-47-5<br>12270-13- | 4,89 | 4 | 4,46 | (a) |
| DDT | 50-29-3-2 | 5,631— | 1 | — | (b) |

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01 044 (1994).
(b) B.V. Oepen. W. Kördel. W. Klein (1991). Chemosphere, 22. pp, 285-304.
(c) Data stillet til rådighed af industrien.

▼B

C.20. **DAPHNIA MAGNA FORMERINGSTEST**

1. **METODE**

Denne testmetode, der undersøger kemikaliers toksiske indflydelse på formeringsevnen, svarer til OECD TG 211 (1998).

1.1. INDLEDNING

Det primære mål for testen er at vurdere kemikaliers indvirkning på Dafphnia magnas formeringsevne.

1.2. DEFINITIONER OG ENHEDER

**Forældregenerationen** er de hundafnier, som er til stede ved testens begyndelse, og hvis formeringsevne er genstand for undersøgelsen.

**Afkom** er de dafnier, der er født af forældregenerationen under testen.

**Laveste koncentration med observeret effekt** (LOEC) er den laveste kemikaliekoncentration, der i testen har vist sig at resultere i en statistisk signifikant indflydelse ($p < 0,05$) på formeringen og dødelighed for forældregenerationen inden for den fastlagte eksponeringstid, sammenlignet med kontrollen. Imidlertid skal alle undersøgte koncentrationer, der ligger over LOEC, have haft en skadelig virkning, som er større end eller lig med den, som er observeret ved LOEC. Hvis ikke disse to krav opfyldes, skal der gøres fuldstændigt rede for fastlæggelsen af LOEC (og dermed NOEC).

**Koncentration uden observeret effekt (NOEC)** er den testkoncentration umiddelbart under LOEC, som ved sammenligning med kontrollen ikke har nogen statistisk signifikant effekt ($p < 0,05$) inden for en fastlagt eksponeringstid.

$\mathbf{EC_X}$ er den koncentration af testkemikaliet opløst i vand, som resulterer i en x procent reduktion i formeringen af Daphnia magna inden for en fastlagt eksponeringstid.

**Den sande formeringshastighed** er det mål for vækst, der integrerer formering og den aldersbetingede dødelighed (20)(21)(22). I en »steady state« population vil den være lig nul. For populationer i vækst vil den være positiv, og for populationer, der mindskes, vil den være negativ. Det er klart, at den sidste situation er uholdbar og vil ende med udslettelse af populationen.

**Den påviselige grænseværdi** er den laveste koncentration, der ses at have effekt, men som ikke kan kvantiteres.

**Den målelige grænseværdi** er den laveste koncentration, der kan kvantiteres.

**Mortalitet** et dyr anses for værende dødt, når det ikke kan bevæge sig, dvs. når det ikke er i stand til at svømme, eller hvis der ikke ses bevægelser af vedhæng eller postabdomen inden for 15 sekunder efter forsigtig omrystning af undersøgelsesbeholderen. (Hvis en anden definition anvendes, skal det meddeles sammen med dets reference).

▼B

1.3. PRINCIPPET FOR TESTMETODEN

Unge hundafnier (forældregenerationen), yngre end 24 timer ved testens begyndelse, udsættes for testkemikaliet opløst i vand i en række koncentrationer. Testens varighed er 21 dage. Ved testens afslutning vurderes det totale antal efterkommere efter den stadig levende forældregeneration. Det betyder, at afkom af dafnier, der er døde i løbet af testen, ikke inkluderes i beregningerne. Forældregenerationens formeringsevne kan udtrykkes på andre måder (f.eks. antal levende efterkommere pr moderdyr fra den første dag, afkom blev observeret), men skal rapporteres sammen med det totale antal afkom frembragt pr. levende moderdyr ved testens afslutning. Formeringsevnen for de dyr, der blev eksponeret for testkemikaliet, sammenlignes med formeringsevnen i kontrollen/kontrollerne for at fastlægge den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og dermed koncentrationen uden observeret effekt (NOEC). Så vidt gørligt skal data desuden analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at vurdere de koncentrationer, der ville forårsage en x % reduktion i formeringsevnen (dvs. $EC_{50}$. $EC_{20}$ eller $EC_{10}$).

Forældregenerationens overlevelse og tiden indtil den første yngel skal også meddeles. Andre effekter af kemikaliet på parametre såsom vækst (dvs. længde) og eventuelt den sande formeringshastighed kan tænkes undersøgt.

1.4. INFORMATION OM TESTKEMIKALIET

Resultatet fra en akut toksicitetstest (se metode C.2, del I) udført med Daphnia magna bør være tilgængelig. Resultatet kan være nyttigt for valget af en passende række af testkoncentrationer i formeringstestene. Opløseligheden i vand og testkemikaliets damptryk bør være kendt ligesom en pålidelig analytisk metode til kvantitering af kemikaliet i testopløsningerne med angivelse af effektivitet med hensyn til genfinding og den målelige grænseværdi.

Data for testkemikaliet, som kan være nyttige for at fastslå testbetingelserne, inkluderer strukturformel, stoffets renhed, lysstabilitet, stabilitet i testforløbet, pKa, $P_{ow}$. og resultater af test for spontan nedbrydning (se metode C.4)

1.5. TESTENS VALIDITET

Hvis en test skal være valid skal følgende resultat-krav opfyldes af kontrollen/kontrollerne:

— forældregenerationens mortalitet (hundafnier) må ikke overstige 20 % ved afslutning af testen

— det gennemsnitlige antal levende afkom pr overlevende forældrehundafnie ved testens afslutning er ≥ 60.

1.6. BESKRIVELSE AF TESTMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Bægerglas og andet apparatur, der kommer i kontakt med testopløsningerne, skal være fremstillet af rent glas eller andet kemisk inert materiale. Karrene til undersøgelsen vil almindeligvis være af glas.

Yderligere nødvendigt apparatur kan være følgende:

— iltmålingsapparatur (med mikroelektrode eller andet passende udstyr til måling af ilt i små volumina)

▼B

— fyldestgørende apparatur til temperaturkontrol

— pH-meter

— apparatur til måling af vands hårdhedsgrad

— apparatur til måling af totalkoncentrationen af organisk kulstof (TOC) i vand eller apparatur til bestemmelse af det kemiske iltbehov (COD)

— fyldestgørende apparatur til kontrol af lys-regime og måling af lys-intensitet.

1.6.2. **Testorganisme**

Den art, der skal benyttes i testen, er Daphnia magna Straus. Andre arter af dafnier kan anvendes, under forudsætning af at de på passende måde opfylder validitetskriterierne. (Det relevante validitetskriterium for dafniearten er formeringsevnen, som den ses i kontrollerne). Hvis der anvendes andre dafniearter, skal de klart defineres og brugen af dem begrundes.

En genotypebestemmelse som identifikation af arten vil være at foretrække. Undersøgelser (1) har vist, at formeringsevnen af Klon A (som stammer fra IRCHA i Frankrig) (3) er stabil med hensyn til det relevante validitetskriterium med sit gennemsnit på $\geq$ 60 stk. afkom pr. forældredafnie, der overlever ved de dyrkningsbetingelser, som nærværende metode beskriver. Andre kloner er imidlertid acceptable, hvis det kan påvises, at dafniekulturen opfylder validitetskriterierne for en test.

Ved testens begyndelse skal dyrene være yngre end 24 timer og må ikke være først udrugede afkom. De skal være efterkommere af en sund population (dvs. uden tegn på stress, såsom høj mortalitet, tilstedeværelse af handyr og ephippier, forsinkelse i fremkomst at første udrugede afkom, misfarvning osv.) De dyr, der siden skal levere forsøgsdyr, skal dyrkes under betingelser (lys. temperatur, medium, fodring og antal dyr pr. volumenenhed), der svarer til dem, der anvendes i testen. Hvis dafnierne rutinemæssigt lever i et andet medium end det, der anvendes i testen, er det god praksis at inkludere en prætest-akklimatiseringsperiode på normalt tre uger (dvs. en generation) for at undgå at stresse forældregenerationen.

1.6.3. **Testmedium**

Det anbefales at anvende et veldefineret medium i denne test. Derved undgås brugen af additiver (f.eks. tang, udtræk af jord), som er vanskeligt at karakterisere, men derimod at forbedre muligheden for standardisering laboratorierne imellem. Elendt M4 (4) og M7 media (se tillæg 1) er fundet velegnede til dette formål. Andre medier kan imidlertid også bruges (f.eks. (5)(6)), forudsat at dafniekulturen opfylder testens validitetskriterier.

Hvis der anvendes medier, der indeholder udefinerede tilsætningsstoffer, skal disse klart specificeres, og der skal fremskaffes oplysninger til testrapporten om sammensætning, særlig med hensyn til kulstofindholdet, da det kan optræde som tilskud til diæten. Det anbefales at fastlægge det totale organiske kulstof- (TOC) og/eller kemiske iltkrav (COD) til det organiske additiv i stamopløsningen, og at der foretages en vurdering af det medfølgende tilskud til TOC/COD i testmediet. Det anbefales, at niveauet af TOC i mediet (før tilsætning af alger) er under 2 mg/l (7).

▼B

Det er vigtigt at gøre sig klart i forbindelse med undersøgelse af kemikalier, der indeholder metaller, at testmediets egenskaber (f.eks. hårdhed, cheleringskapacitet) kan have indflydelse på testkemikaliets toksicitet. Af den grund er et fuldt ud defineret medium ønskværdigt. For tiden er de eneste fuldt ud definerede medier, som er egnede til langtidskulturer med Daphnia magna Elendt M4 og M7. Begge indeholder EDTA som cheleringsmiddel. Work har påvist (2), at cadmiums tilsyneladende toksicitet generelt er lavere, når formeringstesten udføres med M4 og M7 end med medier uden EDTA. Af den grund er M4 og M7 ikke at anbefale, når der skal undersøges kemikalier indeholdende metaller, ligesom andre medier kendt for at have chelerende stoffer ligeledes bør undgås. Til kemikalier, der indeholder metaller, tilrådes brugen af andre medier som f.eks. hårdt ferskvand tilsat ASTM (7), som ikke indeholder EDTA, hvortil sættes ekstrakt af tang (8). Denne kombination af hårdt ferskvand tilsat ASTM med ekstrakt af tang er også velegnet til langtidskulturer og undersøgelse af Daphnia magna (2), endskønt den udøver en let chelerende effekt på grund af den organiske komponent i den tilsatte tangekstrakt.

Under hele testen bør koncentrationen af opløst ilt være over 3 mg/l. pH bør være inden for 6-9 og normalt ikke variere mere end 1,5 enheder. Hårdhed over 140 rng/l (målt som $CaCO_3$) anbefales. Test på dette niveau og derover har vist formeringsevne i overensstemmelse med validitetskriterierne (9)(10).

1.6.4. **Testopløsninger**

Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger bør almindeligvis fremstilles ved opløsning af de relevante kemikalier i testmediet.

Brugen af organiske opløsningsmidler eller dispergenser er i nogle tilfælde nødvendige til fremstilling af en passende koncentreret stamopløsning, men alle anstrengelser bør tages i anvendelse for at undgå brugen af sådanne materialer. Eksempler på passende opløsningsmidler er acetone, ethanol, methanol, dimethylformamid og triethylene glycol. Eksempler på dispergenser er Cremophor RH40, methylcellulose 0,01 % og HCO-40. Under alle omstændigheder bør test-kemikaliet i testopløsningen ikke overskride graden af opløselighed i testmediet.

Opløsningsmidler anvendes til fremstilling af en stamopløsning, som kan doseres i vand med stor nøjagtighed. Med den anbefalede koncentration af opløsningsmiddel i det endelige testmedium (dvs. 0,1 ml/l) vil de ovenfor nævnte opløsningsmidler ikke være toksiske, og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

Dispergensernes funktion er at hjælpe til med en nøjagtig dosering og dispersion. Med den anbefalede koncentration af dispergens i det endelige testmedium (dvs. 0,1 ml/l) vil de ovenfor nævnte dispergenser ikke være toksiske, og de vil heller ikke øge et kemikaliums vandopløselighed.

▼B

1.7. TESTENS DESIGN

Tilsætning til måleglassene og de påfølgende håndteringer af dem bør foretages på en randomiseret måde. Hvis dette ikke gøres, risikerer man bias, som kunne opfattes som resultatet af forskellige koncentrationer. Helt specielt kan dette ses, hvis undersøgelsesrækker håndteres systematisk efter behandling eller koncentrationer, at tidsrelaterede resultater, som f.eks. persontræthed eller anden fejlmulighed, kan medføre større effekt ved de højere koncentrationer. Yderligere, hvis testresultaterne kan tænkes påvirkede af begivenheder ved testens start eller af omgivelserne, som f.eks. karrenes placering i laboratoriet, bør man overveje at dele testen op i grupper.

1.8. FREMGANGSMÅDE

1.8.1. **Omstændigheder ved ekspositionen**

1.8.1.1. *Varighed*

Testen varer 21 dage.

1.8.1.2. *Påfyldning*

Moderdyrene holdes individuelt med ét dyr pr måleglas med 50-100 ml medium i hvert måleglas.

Af hensyn til målinger af koncentrationen af testkemikaliet kan større volumina være nødvendige; det er dog tilladt at foretage den kemiske analyse på en pulje sammensat fra flergangsbestemmelser. Hvis der anvendes volumina større end 100 ml, kan det være nødvendigt at øge fødemængden for at sikre tilstrækkelig fødetilgang for dafnien og overensstemmelse med validitetskriterierne. Hvis der anvendes gennemstrømningstest, kan det af tekniske grunde være nødvendigt med alternative design (f.eks. fire grupper med 10 dyr i et større testvolumen), men enhver ændring i testdesign skal meddeles.

1.8.1.3. *Antal dyr*

Ved semistatiske test skal der være mindst 10 dyr, hver holdt separat, for hver testkoncentration og mindst 10 dyr, hver holdt separat, i kontrolserien.

Det har ved gennemstrømningstest vist sig passende med 40 dyr opdelt i grupper med 10 dyr for hver testkoncentration (1). Man kan anvende et mindre antal testorganismer, og der anbefales da et minimum på 20 dyr pr. koncentration opdelt i dobbelt- eller flergangsbestemmelser med et tilsvarende antal dyr (f.eks. fire bestemmelser med hver fem dafnier). Det bemærkes, at ved test, hvor dyrene holdes gruppevis, vil det ikke være muligt at udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende efterkommere frembragt for hvert levende forældredyr, dersom forældredyr dør i løbet af forsøget. I de tilfælde bør man udtrykke formeringsevnen som det totale antal levende afkom pr. forældredyr, som var i live ved testens begyndelse.

1.8.1.4. *Fodring*

I semistatiske forsøg bør fordring foretages daglig eller i hvert fald tre gange ugentlig (dvs. i sammenhæng med udskiftning af medium). Afvigelser fra dette (f.eks. for gennemstrømningstest) skal meddeles.

▼B

Under forsøget bør diæten for forældredyr fortrinsvis være levende algeceller af en eller flere af følgende: Chlorella sp., Selenastrum capricornutum (nu Pseudokirchneriella subcapitata (11)) og Scenedesmus subspicatus. Den tilførte diæt skal baseres på mængden af organisk kulstof (C) for hvert forældredyr. Undersøgelser (12) har vist, at for Daphnia magna er det tilstrækkeligt med fodermængder af størrelsesordenen 0,1 til 0,2 mg C/Daphnia/døgn med henblik på det ifølge validitetskriterierne ønskede antal afkom. Fodermængden kan enten være konstant gennem hele forsøgsperioden eller, om det ønskes, kan der gives en lavere mængde til at begynde med og siden lade mængden forøges for at tage hensyn til forældredyrets vækst under forløbet. I sidstnævnte tilfælde bør fodermængden i hele perioden stadig være inden for de anbefalede mængder på 0,1 til 0,2 mg C/Daphnia/døgn.

Måling af kulstofindhold er tidsrøvende, men hvis erstatningsmålinger, som f.eks. celletal af alger eller lysabsorption, anvendes for nemheds skyld for at afmåle den korrekte fødemængde, må hvert laboratorium fremstille et nomogram, som sammenholder erstatningsmålingen med kulstofindholdet i algekulturen (se tillæg 2 for rådgivning om konstruktion af nomogram). Nomogrammer skal kontrolleres mindst en gang årligt og hyppigere, hvis betingelserne for algerne er ændrede. Det er vist, at lysabsorption er en bedre erstatning end celletælling til beregning af kulstofindhold (13).

Man bør tilføre dafnierne algesuspensionen i koncentreret form, således at mindst muligt af algekulturmediet overføres til forsøgskarret. Opkoncentrering af alger kan foretages ved centrifugering efterfulgt af resuspension i destilleret vand eller deioniseret vand eller dafniekulturmedium.

1.8.1.5. *Lys*

16 timers lys med en intensitet, der ikke overstiger 15-20 μE $m^{-2}$ $s^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatur*

Testmediets temperatur skal ligge mellem 18 og 22 °C. I det enkelte forsøg bør temperaturen, om muligt, ikke variere mere end 2 °C (f.eks. 18-20, 19-21 eller 20-22 °C). Det kan være på sin plads at anvende et forsøgskar yderligere til brug for temperaturmonitoreringen.

1.8.1.7. *Gennemluftning*

Måleglassene må ikke gennemluftes under forsøget.

1.8.2. **Testkoncentrationer**

Normalt bør der være mindst fem testkoncentrationer arrangeret i en geometrisk række med en adskillelsesfaktor, som helst ikke bør overstige 3.2, og der skal udføres det passende antal af flergangsbestemmelser for hver testkoncentration (se 1.8.1.3). Begrundelse skal angives, hvis færre end fem koncentrationer undersøges. Kemikalier bør ikke testes i koncentrationer, der overstiger opløseligheden i testmediet.

▼B

Når range for koncentrationerne skal fastlægges, bør følgende tages i betragtning:

i) Hvis formålet er at opnå LOEC/NOEC, skal den laveste testkoncentration være så lav, at frugtbarheden ved denne koncentration ikke adskiller sig signifikant fra kontrollens. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med formindsket laveste koncentration.

ii) Hvis formålet er at opnå LOEC/NOEC, bør den højeste testkoncentration være så høj, at frugtbarheden ved denne koncentration er signifikant lavere end i kontrollen. Hvis det ikke er tilfældet, skal testen gentages med forøget højeste koncentration.

iii) Hvis $EC_X$ for indvirkning på formeringsevner, beregnes, er det tilrådeligt, at der anvendes tilstrækkeligt mange koncentrationer til, at $EC_X$ kan defineres med passende sikkerhed. Hvis $EC_{50}$ for indvirkning på formeringsevnen beregnes, er det tilrådeligt, at den højeste testkoncentration er større end den ved $EC_{50}$. Ellers vil sikkerhedsgrænserne for $EC_{50}$ blive meget vide, og selvom man kan beregne $EC_{50}$, er det ikke muligt i tilstrækkelig grad at vurdere, om forsøget har været fyldestgørende.

iv) Range for testkoncentrationerne bør ikke inkludere koncentrationer, der har en statistisk signifikant indflydelse på forældredyrets overlevelse, da det vil ændre undersøgelsens natur fra en simpel formeringstest til en kombineret formerings- og overlevelsestest, som stiller krav om mere komplekse statistiske analyser.

Kendskab på forhånd til testkemikaliets toksicitet (f.eks. fra en hurtig test og/eller fra undersøgelser over range) kan hjælpe til at finde passende testkoncentrationer.

Når et opløsningsmiddel eller et dispergens er anvendt i præparationen af testopløsningen (se 1.6.4), bør slutkoncentrationen i måleglasset ikke være større end 0,1 ml/l og desuden være den samme i alle måleglassene.

1.8.3. **Kontroller**

Sideløbende med testserien bør udføres en testmediumkontrol og ligeledes, hvis det er relevant, en kontrolserie, som indeholder opløsningsmiddel eller dispergens i koncentrationer som dem, der anvendes i forsøget. Der skal udføres et passende antal flergangsbestemmelser (se 1.8.1.3).

Almindeligvis vil variationskoefficienten for det gennemsnitlige antal afkom pr forældredyr i kontrollen/kontrollerne i en vellykket test være $\leq$ 25, og dette skal meddeles fra testdesign, hvor dyrene har været holdt alene.

1.8.4. **Fornyelse af medium**

Hyppigheden for fornyelse af mediet afhænger af testkemikaliets stabilitet, men fornyelse bør foretages mindst tre gange om ugen. Hvis man ved fra forudgående stabilitetsundersøgelser, at testkemikaliet ikke er stabilt (dvs. uden for range 80-120 % af den nominelle koncentration eller falder under de 80 % af den målte begyndelseskoncentration) og ændrer sig i løbet af den maksimale fornyelsesperiode (dvs. tre døgn), bør man overveje at skifte mediet hyppigere eller at gå over til en gennemstrømningstest.

▼B

Når mediet skal fornyes i semistatiske test, er der fremstillet en anden række af måleglas, og forældredyret flyttes over til dem f.eks. ved hjælp af en glaspipette med en passende diameter. Mindst muligt medium bør overflyttes sammen med dafnien.

1.8.5. **Observationer**

Resultatet af undersøgelser gjort under forsøget skal noteres på dataark (se eksempler i tillæg 3 og 4). Hvis der ønskes andre målinger (se 1.3 og 1.8.8), kan det være nødvendigt med andre undersøgelser.

1.8.6. **Afkom**

Det er bedst dagligt at fjerne og tælle afkom fra hvert forældredyr fra første dag, der ses yngel, for at hindre ynglen i at indtage den føde, der var tiltænkt forældredyret. Undersøgelsens formål kræver kun, at man tæller antal levende afkom, men tilstedeværelsen af aborterede æg eller dødt afkom bør også noteres.

1.8.7. **Mortalitet**

Dødelighed blandt forældredyrene bør noteres dagligt og i hvert fald samtidigt med, at afkommet tælles.

1.8.8. **Andre parametre**

Selvom metoden principielt er designet til at vurdere virkning på formeringsevnen, er det muligt, at andre virkninger kan kvantiteres, så der kan fortages statistiske beregninger. Målinger af vækst er særdeles ønskværdige, eftersom de giver informationer om mulige subletale virkninger, som kan tænkes at være mere nyttige end måling alene af formeringsevnen; det anbefales, at man ved forsøgets afslutning måler længden af forældredyrene (dvs. kropslængden minus den anale spina). Andre parametre kan måles eller beregnes såsom tiden til fremkomst af den første yngel (og den påfølgende yngel), antal og størrelse af yngel pr. dyr, antallet af aborteret yngel, tilstedeværelse af handyr eller ephippier, populationens egentlige formeringshastighed.

1.8.9. **Hyppighed af analyser og målinger**

Ilt-koncentration, temperatur, hårdhedsgrad og pH-værdier bør måles i hvert fald hver uge i nye og gamle medier, i kontroller og i opløsninger med den højeste koncentration af testkemikaliet.

Mens forsøget løber, måles koncentrationen af testkemikaliet med regelmæssige intervaller.

I semistatiske test, hvor koncentrationen af testkemikaliet forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration (dvs. inden for range 80-120 % — se 1.4 og 1.8.4), anbefales det som et minimum at måle højeste og laveste testkoncentration ved fremstillingen og i forbindelse med udskiftning ved en lejlighed i den første uge af forsøget (dvs, analyser skal udføres på en prøve fra samme opløsning — frisk fremstillet og ved en fornyelse). Disse målinger bør gentages mindst ugentligt derefter.

▼B

I forbindelse med test, hvor testkemikaliet ikke forventes at holde sig inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle testkoncentrationer, når de er frisk fremstillede og ved udskiftning. I de test, imidlertid, hvor testkemikaliets målte begyndelseskoncentration ikke ligger inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, men hvor der er tilstrækkelig bevis for, at begyndelsesværdierne kan genfindes og er stabile (dvs. inden for range 80-120 % af begyndelseskoncentrationen), kan kemiske målinger reduceres i uge 2 og 3 til kun at omfatte den højeste og den laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver man før fornyelse kun at bestemme testkemikaliets koncentration i et af måleglassene i en flergangsbestemmelse for hver af testkoncentrationerne.

Anvendes en gennemstrømningstest, er et analyseregime svarende til de semistatiske test passende (men i dette tilfælde er måling på »gamle« opløsninger ikke mulig). I den første uge kan det være tilrådeligt at øge antallet af prøvetagninger (f.eks. tre hold målinger) for at sikre, at testkoncentrationerne holder sig stabile. I den type test bør gennemstrømningshastigheden for fortyndingsvæske og testkemikalium kontrolleres daglig.

Hvis det viser sig, at koncentrationen af det undersøgte kemikalium på tilfredsstillende måde er holdt inden for ± 20 % af den nominelle eller målte begyndelseskoncentration gennem hele testforløbet, kan resultaterne baseres på de nominelle eller målte begyndelseskoncentrationer. Hvis afvigelsen fra den nominelle eller målte begyndelseskoncentration er større end ± 20 %, skal resultaterne udtrykkes som tidsvægtet gennemsnit (se tillæg 5).

## 2. DATA OG RAPPORTERING

### 2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Formålet med denne test er at bestemme virkningen af testkemikaliet på det totale antal levende afkom pr, forældredyr, som er i live ved forsøgets afslutning. Det totale antal afkom pr. forældredyr skal beregnes for hver beholder (dvs. hver enkeltbestemmelse). Viser det sig ved en enkeltbestemmelse, at forældredyret dør under forsøget, eller at det er af hankøn, ekskluderes denne enkeltbestemmelse fra analysen. Analysen vil så blive baseret på et reduceret antal enkeltbestemmelser.

Vurderingen af LOEC og dermed NOEC for virkningen af kemikaliet på det totale antal afkom forudsætter en beregning af det gennemsnitlige antal afkom på tværs af enkeltbestemmelserne for hver koncentration samt den samlede residuale standarddeviation. Dette kan gøres ved hjælp af en variansanalyse (ANOVA). Gennemsnittet for hver koncentration skal så sammenholdes med kontrolgennemsnittet ved hjælp af en passende metode til multiple sammenligninger. Dunnetts eller Williams test kan være anvendelige (14) (15) (16) (17). Det er nødvendigt at kontrollere, at ANOVA-forudsætningen om varianshomogenitet holder stik. Det anbefales, at dette gøres grafisk snarere end ved en formel signifikanstest (18). Et passende alternativ er Bartletts test. Hvis den nævnte forudsætning ikke holder, bør man overveje at transformere data med henblik på sikring af homogenitet før udførelse af ANOVA eller at udføre en vægtet ANOVA. Størrelsen af den virkning, der kan påvises med ANOVA (dvs. mindste signifikante forskel), skal beregnes og meddeles.

▼B

Til vurdering af den koncentration, som medfører en 50 % reduktion af det totale antal afkom (dvs. $EC_{50}$), konstrueres en passende kurve, f.eks. en logistisk kurve, som er tilpasset data ved hjælp af en statistisk metode, f.eks. de mindste kvadraters metode. Kurven skal parameteriseres, således at $EC_{50}$ og standardfejlen på denne kan aflæses direkte. Dette vil lette beregningen af sikkerhedsgrænserne for $EC_{50}$. Medmindre der er gode grunde ti! at foretrække andre sikkerhedsgrænser, skal tosidede 95 %-sikkerhedsgrænser meddeles. Tilpasningsproceduren skal helst tillade en vurdering af signifikansen af den manglende overensstemmelse. Man kan gøre dette grafisk, eller man kan inddele den residuale kvadratsum i to komponenter: manglende overensstemmelse og tilfældig variation, hvorefter man udfører en signifikanstest for den manglende overensstemmelse. Eftersom behandlinger, der medfører højere frugtbarhed, må formodes at udvise større varians i antallet af afkom end behandlinger, der medfører lav frugtbarhed, bør man overveje at vægte de observerede data, så de afspejler de forskellige varianser i de forskellige behandlingsgrupper (se baggrundsinformation i henvisning (18)).

Ved analysen af data fra den endelige »ringtest« (2) tilpassedes en logistisk kurve ved hjælp af følgende model, selvom andre passende modeller kan anvendes:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

hvor:

Y = totale antal afkom pr. forældredyr, som var i live ved forsøgets afslutning (beregnet for hver beholder)

x = substanskoncentrationen

c = det forventede antal afkom, når x = 0

$x_0$ = $EC_{50}$ i populationen

b = hældningen.

Denne model vil formentlig være passende i et stort antal tilfælde, men der vil være forsøg, hvor den ikke er adækvat. Man bør vurdere modellens validitet som foreslået ovenfor. I nogle tilfælde vil det være passende at anvende en hormese-model, hvor lave koncentrationer giver en øget virkning (19).

Andre virkningskoncentrationer, såsom $EC_{10}$ eller $EC_{20}$ kan også estimeres. men de! kan i så fald være formålstjenligt at anvende en parameterisering af modellen, som er forskellig fra den, der anvendtes til at estimere $EC_{50}$.

2.2. TESTRAPPORT

Test-rapporten skal indeholde:

2.2.1. **For test-kemikaliet:**

— fysiske natur og relevante fysisk-kemiske egenskaber

▼B

— data vedrørende den kemiske identifikation inklusive renhedsgrad.

2.2.2. **For dyrearten:**

— klonen (om den er blevet genotypebestemt), leverandør eller kilde (hvis kendt) og dyrkningsbetingelserne. Hvis en anden art end Daphnia magna anvendes, skal det meddeles og begrundes.

2.2.3. **Testomstændigheder:**

— den anvendte test-procedure (f.eks. semistatisk eller gennemstrømning, volumen, antal dafnier pr liter ved påfyldning

— lysperiode og lysintensitet

— testdesign (f.eks. antal flergangsbestemmelser, antal forældredyr pr måleglas)

— detaljer vedrørende kulturmediet

— eventuel tilsætning af organisk materiale, inkluderende sammensætning, kilde, fremstillingsmetode, stamopløsningens TOC/COD, vurdering af resulterende TOC/COD i testmediet

— detaljeret information angående fodring, inklusive mængde (i mg C/Dafnia/døgn) og liste (f.eks. fodertype(r)) inklusive algernes specifikke navn (arten) og, hvis kendt, herkomst og dyrkningsbetingelserne

— måde til fremstilling af stamopløsninger og hyppighed af fornyelse (evt. opløsningsmidler eller dispergenser og deres koncentrationer skal opgives).

2.2.4. **Resultater**

— resultater af ethvert forudgående studium af test-kemikaliets stabilitet

— de nominelle testkoncentrationer og resultaterne af alle analyser til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet i måleglasset (se eksempler på dataark i tillæg 4); metodens genfindingsevne og dens grænser skal også meddeles

— vandets kvalitet i måleglasset (dvs. pH, temperatur, koncentrationen af opløst ilt og TOC og/eller COD og hårdhedsgrad, hvor dette er relevant) (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— fuld fortegnelse over levende afkom efter hvert moderdyr (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— antal døde moderdyr og dagen for hændelsen (se eksempler på data-ark i tillæg 3)

— variationskoefficiemen for frugtbarhed i kontrollerne (baseret på det totale antal afkom pr forældredyr, som er i live ved testens afslutning)

— det totale antal af levende afkom pr. forældredyr (for hver af flergangsbestemmelserne), som er i live ved testens afslutning plottet over for koncentrationen af testkemikaliet

— laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) med hensyn til frugtbarhed, inklusive en beskrivelse af den anvendte statistiske fremgangsmåde og en angivelse af, hvilken virkningsstørrelse der kunne måles og koncentration uden observeret effekt (NOEC) med hensyn til frugtbarhed: hvor relevant opgives ligeledes LOEC/NOEC-mortaliteten for forældredyrene

▼B

— hvor relevant ECx med hensyn til frugtbarhed og sikkerhedsgrænser og en graf af den model, der var anvendt til beregningen, hældningen på dosis-responskurven og standardfejlen

— andre observerede biologiske virkninger eller målinger: der skal rapporteres enhver biologisk virkning, som blev observeret eller målt (f.eks. forældredyrenes vækst) inklusive relevante begrundelser

— forklaringer for enhver afvigelse fra testmetoden.

**HENVISNINGER**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK. 20-21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C, Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L, (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol, 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macromvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B.R., Forte J.L and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, pp. 2053-2058.

▼B

(13) Sims i. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. j. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp. 4S2-491.

(16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp. 103-117.

(17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N.R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biolog}', New York, pp. 532.

(22) Meyer). S., Ingersoll C.G., McDonald L.L and Boyce M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67. pp. 1156-1166.

▼B

*Tillæg 1*

## KOMPLET FREMSTILLING AF MEDIERNE M7 OG M4

### Akklimatisering til Medierne Elendt M7 og M4

Nogle laboratorier har haft problemer med at overflytte datnier direkte til M4- (1) og M7-medierne. Imidlertid har en gradvis akklimatisering givet nogen succes; man flytter dafnierne fra deres eget medium til et 30 % Elendt, siden til et 60 % Elendt og så til et 100 % Elendt. Akklimatiseringsperioden kan være på op til en måned.

FREMSTILLING

### Sporelementer

Separate stamopløsninger (I) med de forskellige sporstoffer fremstilles primært i vand af passende renhedsgrad, f.eks. de-ioniseret, destilleret vand eller vand renset ved omvendt osmose. Ud fra disse forskellige stamopløsninger (I) fremstilles en sekundær stamopløsning (II), som indeholder alle sporstofferne (kombinationsopløsningen), som følger:

| Stamopløsning I (enkelt stof) | Antal mg sat til 1 liter vand | Koncentrationer (refererende til M4) (fold) | For at fremstille stamopløsning Il tilsættes nedennævnte antal ml af stamopløsning i til 1 liter vand | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2$ * $4H_2O$ | 7 210 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2$ * 6 $H_20$ | 3 040 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $Na_2Mo0_4$ * 2 $H_2O$ | 1 260 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2$ * 2 $H_2O$ | 335 | 20 000 | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2$ * 6 $H_2O$ | 200 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| Kl | 65 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 20 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2EDTA$ * 2 $H_2O$ | 5 000 | 2 000 | — | — |
| $FeSO_4$ * 7 $H_20$ | 1 991 | 2 000 | _ | _ |
| $Na_2EDTA$- og $FeSO_4$-opløsningerne fremstilles hver for sig. hældes sammen og autoklaveres straks. Dette giver: | | | | |
| 21 Fe-EDTA-opløsning | | 1 000 | 20,0 | 5,0 |

▼B

**M4- og M7-medierne**

M4- og M7-medierne fremstilles ved hjælp af stamopløsning II, makronæringsstofferne og vitaminerne som følger:

| | Antal mg sat til 1 liter vand | Koncentrationer (relateret til medium M4) (fold) | Antal ml af stamopløsning, der sættes til 1 liter for at fremstille mediet | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Stamopløsning II samlede sporstoffer | | 20 | 50 | 50 |
| Stamopløsning med makro-næringsstoffer (enkelte stoffer) | | | | |
| $CaCl_2$ * 2 $H_2O$ | 293 800 | 1 000 | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4$* 7 $H_2O$ | 246 600 | 2 000 | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000 | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SiO_3$ * 9 $H_2O$ | 50 000 | 5 000 | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| Kombineret vitaminopløsning | — | 10 000 | 0,1 | 0,1 |
| Den kombinerede vitaminopløsning fremstilles ved at sætte de 3 vitaminer til 1 liter vand som vist nedenfor: | | | | |
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 10 000 | — | — |
| Cyanocobalamin ($B_{12}$) | 10 | 10 000 | — | — |
| Biotin | 7,5 | 10 000 | — | — |

Den kombinerede vitaminopløsning opbevares i små mængder i frossen tilstand. Vitaminerne sættes til mediet kort før brugen.

*NB* For at undgå udfældning af salte, når det fuldstændige medium fremstilles, skal man tilsætte de enkelte opløsninger til 500-800 ml deioniseret vand og derefter fylde op til 1 liter.

*NNB* Den første publicerede beskrivelse af M4-mediet kan findes i Elendt, B.P. (1990) Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼B

*Tillæg 2*

**ANALYSE FOR DET TOTALE ORGANISKE KULSTOF (TOC) OG FREMSTILLING AF NOMOGRAM TIL TOC-INDHOLDET I ALGEFODERET**

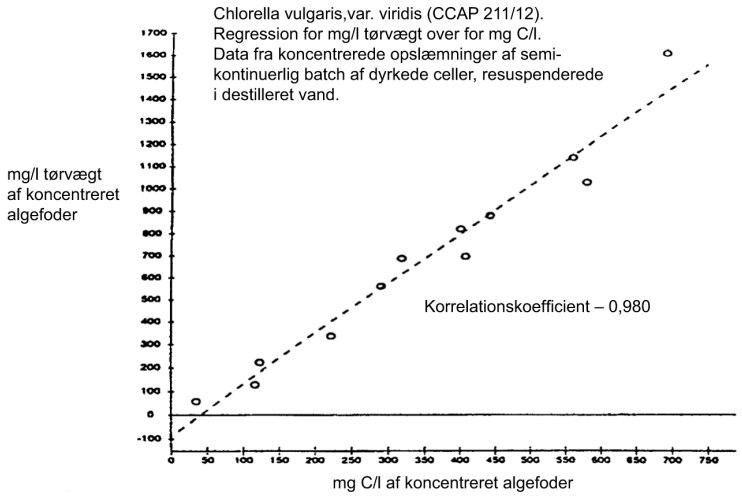
Det erkendes, at kulstofindholdet i algefoderet almindeligvis ikke vil blive målt direkte, men ud fra korrelationer (dvs. nomogrammer med erstatningsmålinger, såsom antallet af algeceller eller lysabsorbans).

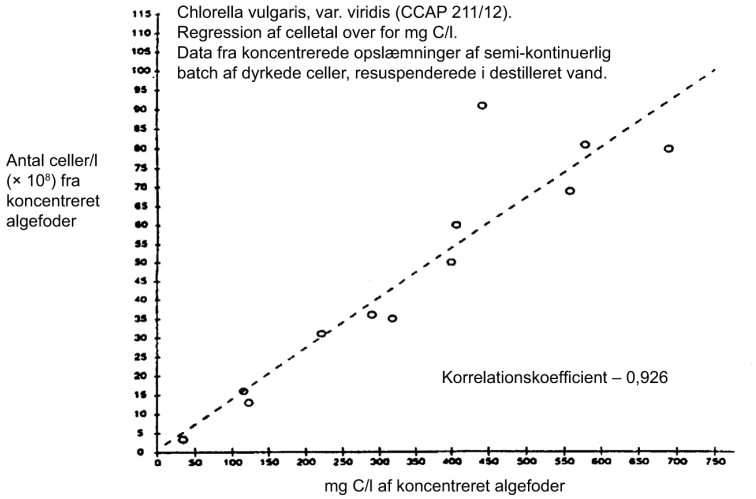
TOC bør måles ved oxidation ved høje temperaturer snarere end ved UV eller persulphate metoder. (Se: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Med henblik på fremstilling af nomogrammer skal algerne adskilles fra dyrkningsmediet ved centrifugering med påfølgende resuspension i destilleret vand. Mål erstatningsparameteren og TOC-koncentrationen i hver prøve som en tredobbelt bestemmelse. Blindværdier måles i destilleret vand, og TOC-koncentrationen trækkes fra TOC-værdien i algeprøven.

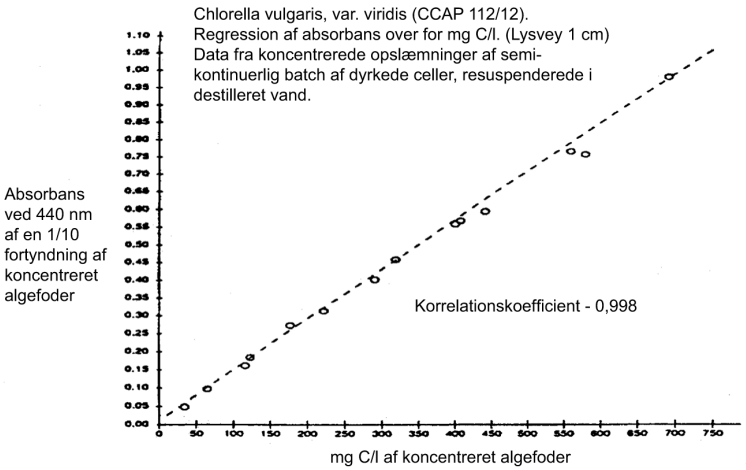
Nomogrammet skal være lineært i hele området over kulkoncentrationer. Eksempler ses nedenfor:

NB: Værdierne fra det her viste nomogram må ikke anvendes; det er essentielt at laboratorierne selv fremstiller deres egne nomogrammer.



▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Regression af absorbans over for mg C/l. (Lysvey 1 cm)
Data fra koncentrerede opslæmninger af semi-kontinuerlig batch af dyrkede celler, resuspenderede i destilleret vand.
Absorbans ved 440 nm af en 1/10 fortyndning af koncentreret algefoder
Korrelationskoefficient - 0,998
mg C/l af koncentreret algefoder

▼B

*Tillæg 3*

**EKSEMPEL PÅ DATAARK TIL NOTATER OM FORNYELSE AF MEDIUM, FYSISK/KEMISK MONITORERING, FODRING, FORMERING OG MORTALITET BLANDT VOKSNE DAFNIER**

| Eksperiment nr. | Startdato: | Klon: | Medium: | Fodertype: | Testkemikalium: | Nominel koncentration: |
|---|---|---|---|---|---|---|

| Dag | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fornyelse af medium (sæt kryds) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ny | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | gammel | |
| $O_2$ mg/l (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ny | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | gammel | |
| Temperatur (°C) (1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ny | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | gammel | |
| Fodring (sæt kryds) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Antal levende afkom (2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
| Måleglas 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

2008R0440 — DA — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

| Eksperiment nr. | Startdato: | Klon: | Medium: | Fodertype: | Testkemikalium: | Nominel koncentration: |
|---|---|---|---|---|---|---|

| Dag | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
| Kumulativ voksenmortalitet ([3]) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

([1]) Angiv hvilket glas, der blev anvendt til undersøgelsen.
([2]) Anfør aborteret afkom som AB i det relevante felt.
([3]) Anfør mortalitet for ethvert voksent dyr som M i det relevante felt.

▼B

*Tillæg 4*

**EKSEMPEL PÅ DATAARK MED RESULTATER AF KEMISKE ANALYSER**

a) **Målte koncentrationer**

| Nominel koncentration | Prøver i uge 1 | | Prøver i uge 2 | | Prøver i uge 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ny | gammel | ny | gammel | ny | gammel |
| | | | | | | |

b) **Målte koncentrationer i procent af nominelle**

| Nominel koncentration | Prøver i uge 1 | | Prøver i uge 2 | | Prøver i uge 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ny | gammel | ny | gammel | ny | gammel |
| | | | | | | |

▼B

*Tillæg 5*

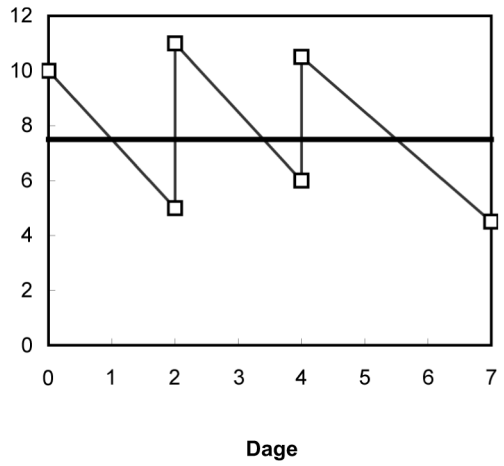
## BEREGNING AF TIDSVÆGTET GENNEMSNIT

### Tidsvægtet gennemsnit

Idet koncentrationen af testkemikaliet kan falde i perioden mellem fornyelsen af medierne, er det nødvendigt at overveje, hvilken koncentration der skal vælges som repræsentant for variationen af koncentrationer, som den voksne dafnie bliver udsat for. Valget skal baseres på såvel biologiske som statistiske betragtninger. Hvis for eksempel formeringen formodes mest påvirket af den højeste koncentration, så skal den anvendes. Hvis imidlertid den akkumulerede effekt eller langtidseffekten fra det toksiske stof regnes for mere vigtigt, så er gennemsnitskoncentrationen mere relevant. I dette tilfælde er den tidsvægtede gennemsnitskoncentration det passende at anvende, eftersom den tager hensyn til variationen af hvert øjebliks koncentration i tidsforløbet.

**Figur 1**

**Eksempel på tidsvægtet gennemsnit**




Figur 1 viser som eksempel et (forenklet) forsøg over syv dage med en fornyelse af mediet på dag 0, 2 og 4.

Zigzaglinjen repræsenterer koncentrationen på ethvert tidspunkt. Faldet i koncentration formodes at følge en eksponential henfaldsproces.

De seks angivne punkter repræsenterer de målte koncentrationer ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode.

Den tykke, solide linje angiver placeringen af det tidsvægtede gennemsnit.

Det tidsvægtede gennemsnit er beregnet, så arealet under det tidsvægtede gennemsnit har samme størrelse som arealet under koncentrationskurven. Beregningen af det ovenfor viste eksempel ses i tabel 1.

▼B

*Tabel 1*

**Beregning af tidsvægtet gennemsnit**

| Fornyelse nr. | Dage | Konc0 | Konc1 | Ln(Konc0) | Ln(Konc1) | Areal |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 10,000 | 4,493 | 2,303 | 1,503 | 13,767 |
| 2 | 2 | 11,000 | 6,037 | 2,398 | 1,798 | 16,544 |
| 3 | 3 | 10,000 | 4,066 | 2,303 | 1,403 | 19,781 |
| Totale antal dage: 7 | | | | | Totale areal | 50,091 |
| | | | | | TW gennem-snit | 7,156 |

»Dage« er antallet af dage i fornyelsesperioden.

»Konc0« er den målte koncentration ved begyndelsen af hver fornyelsesperiode.

»Konc1« er den målte koncentration ved afslutningen af hver fornyelsesperiode.

»Ln(Konc0)« er den naturlige logaritme til Konc0.

»Ln(Konc1l)« er den naturlige logaritme til Konc1.

»Arealet« er arealet under eksponentialkurven for hver fornyelsesperiode. Det beregnes således:

$$Areal = \frac{Konc0 - Konc1}{Ln(Konc0) - Ln(Konc1)} \times dage$$

Det tidsvægtede gennemsnit (TW gennemsnit) er det »totale areal« divideret med de »totale antal dage«.

Tabellen vil selvfølgelig strække sig over 21 dage i forbindelse med dafnieformeringstesten.

Det er klart, at når der kun foretages målinger ved begyndelsen og slutningen af hver fornyelsesperiode, kan man ikke bekræfte, at henfaldsprocessen er eksponentiel. En anderledes kurve ville resultere i en anderledes beregning for arealet. En eksponential henfaldsproces er dog ikke usandsynlig, og den er den bedste kurve at anvende, når der ikke foreligger andre informationer.

Stor omhu må udvises, hvis en kemisk analyse ikke kan påvise test-kemikaliet ved afslutningen af en fornyelsesperiode. Medmindre man kan påvise, med hvilken hastighed testkemikaliet forsvandt fra opløsningen, er det ikke muligt at finde frem til et realistisk areal under kurven, hvilket medfører, at det er umuligt at finde frem til et rimeligt tidsvægtet gennemsnit.

▼B

C.21. **JORDMIKROORGANISMER: KVÆLSTOFOMDANNELSESTEST**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 216 (2000).

1.1. INDLEDNING

Den beskrevne metode er en laboratoriemetode til undersøgelse af langtidsvirkningerne på jordmikroorganismers kvælstofomdannende aktivitet af enkeltstående eksponering for kemiske stoffer. Metoden er hovedsagelig baseret på anbefalinger fra Plantebeskyttelsesorganisationen for Europa og Middelhavsområderne (1). Der er endvidere taget hensyn til guidelines fra den tyske Biologische Bundesanstalt (2), den amerikanske miljøstyrelse (3), SETAC (4) og Den Internationale Standardiseringsorganisation (5). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate, Italien, i 1995 (6), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test. Anbefalingerne for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver er baseret på en ISO-vejledning (7) og på anbefalingerne fra workshoppen i Belgirate, Ved vurdering af prøvestoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at bestemme virkningerne på den mikrobielle aktivitet i jord, f.eks. når der kræves oplysninger om plantebeskyttelsesmidlers potentielle bivirkninger på mikrofloraen i jorden, eller når jordmikroorganismer forventes udsat for andre kemiske stoffer end plantebeskyttelsesmidler. Kvælstofomdannelsesprøven udføres for at bestemme virkningerne af sådanne kemiske stoffer på mikrofloraen i jorden. Ved test af landbrugskemikalier (f.eks. plantebeskyttelsesmidler, kunstgødning og skovbrugskemikalier) udføres både kvælstofomdannelses- og kulstofomdannelsestest. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier er kvælstofomdannelsestesten tilstrækkelig. Viser sådanne kemiske stoffer sig imidlertid i kvælstofomdannelsestesten at have en $EC_{50}$-værdi i samme område som gængse nitrifikationsinhibitorer (f.eks. nitrapyrin), kan en kulstofomdannelsestest udføres for at skaffe yderligere oplysninger.

Jord består af levende og ikke levende komponenter, som er til stede i komplekse og heterogene blandinger. Mikroorganismer spiller en vigtig rolle i nedbrydning og omdannelse af det organiske stof i frugtbar jord, og mange arter bidrager til flere forskellige aspekter af jordens frugtbarhed. Hvis der gennem længere tid gribes ind i disse biokemiske processer, kan det gribe ind i næringsstofcyklussen, således at jordens frugtbarhed ændrer sig. Kulstof- og kvælstofomdannelse finder sted i al frugtbar jord. Skønt det alt efter jordtypen er forskellige mikrobielle samfund, som er ansvarlige for disse processer, følger omdannelsen i det væsentlige altid samme vej.

Den her beskrevne forsøgsmetode anvendes til bestemmelse af stoffers langsigtede skadevirkning på kvælstofomdannelsesprocessen i jordens aerobe dæklag. Metoden giver desuden mulighed for at bedømme stoffernes indvirkning på den mikrobielle kulstofomdannelse i jorden. Efter nedbrydning af bindingerne mellem kulstof og kvælstof dannes nitrat. Finder man lige stor nitratproduktion i den behandlede jord og i kontroljord, er de vigtigste kulstotfnedbrydningsveje derfor højst sandsynligt intakte og funktionsdygtige. Det ved testen anvendte substrat (finmalet lucernemel) har et gunstigt kulstof-/kvælstofforhold (sædvanligvis mellem 12/1 og 16/1). Dette mindsker kulstofmanglen under testen, og hvis de mikrobielle samfund beskadiges af et kemikalie, kan de muligvis komme på fode inden for 100 dage.

▼B

De test, som metoden oprindeligt er baseret på, er hovedsagelig udviklet til stoffer, for hvilke den til jorden tilførte mængde er kendt på forhånd. Det er f.eks. tilfældet for plantebeskyttelsesmidler, hvor spredemængden i marken kendes. For landbrugskemikalier er det tilstrækkeligt at teste to doser, som er relevante for den forventede eller forudsete spredemængde. Landbrugskemikalier kan enten testes som aktivt indholdsstof eller som færdigformuleret produkt. Testen er dog ikke begrænset til landbrugskemikalier. Ved at ændre dels den tilførte mængde teststof til jorden, dels metoden til vurdering af data kan man desuden anvende testen på kemiske stoffer, hvor man ikke kender den mængde, som vil nå jorden. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier bestemmes virkningen af en række koncentrationer på kvælstofomdannelsen. Data fra disse forsøg anvendes til at opstille en dosis-responskurve og beregne værdier af $EC_x$ hvor x er den definerede virkning i %.

1.2. DEFINITIONER

**Kvælstofomdannelse**: den fuldstændige mikrobielle nedbrydning af kvælstofholdigt organisk stof via ammonifikations- og nitrifikationprocesser til det pågældende uorganiske nitrat som slutprodukt.

**$EC_x$ (effektiv koncentration)**: den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en hæmning på x procent af kvælstofomdannelsen til nitrat.

**$EC_{50}$ (effektiv mediankoncentration)**: den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en 50 % hæmning af kvælstoffets omdannelse til nitrat.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Siet jord forbedres med finmalet plantemel og behandles enten med prøvestoffet eller lades ubehandlet (kontrol). Til test af landbrugskemikalier anbefales mindst to prøvekoncentrationer, som vælges i henhold til den højeste forventede koncentration i marken. Efter 0, 7, 14 og 28 døgns inkubation ekstraheret prøver af behandlet jord og kontroljord med et passende opløsningsmiddel, og nitratmængden i ekstrakterne bestemmes. Nitratomdannelsen i de behandlede prøver sammenholdes med omdannelsen i kontrolprøverne, og den procentuelle afvigelse af de behandlede prøver fra kontrolprøverne beregnes. Alle forsøg løber over mindst 28 døgn. Er forskellen mellem behandlet og ubehandlet jord 25 % eller derover på dag 28, fortsættes målingerne indtil højst 100 dage. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier tilsættes en række koncentrationer af prøvestoffet til jordprøverne, og den dannede mængde kvælstof i behandlede prøver og kontrolprøver måles efter 28 døgns inkubation. Resultaterne af forsøg med flere koncentrationer analyseres efter en regressionsmodel, og $EC_x$-værdierne beregnes (dvs. $EC_{50}$, $EC_{25}$ og/eller $EC_{10}$). Jf. definitionerne.

1.5. FORSØGETS VALIDITET

Vurdering af forsøgsresultater med landbrugskemikalier bygger på nogle forholdsvis små forskelle (gennemsnitligt ± 25 %) mellem nitratkoncentrationen i kontrolprøver og i behandlet jord, hvorfor store variationer i kontrolprøverne kan give forkerte resultater. Afvigelsen mellem gentagne kontrolprøver skal derfor være mindre end ± 15 %.

▼B

1.6. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.6.1 **Apparatur**

Prøvebeholderne skal være udført i kemisk inaktivt materiale. De skal have passende kapacitet svarende til den metode, der anvendes til inkubation af jordprøverne, dvs. inkubation af den samlede mængde eller som en række individuelle jordprøver (jf. 1.7.1.2), Der skal være draget omsorg både for at vandtabet minimeres og at gasser kan udveksles under prøven (f.eks. kan prøvebeholderne tildækkes med perforeret polyethylenfolie). Ved test af flygtige stoffer skal anvendes forseglede og gastætte beholdere. Beholderne skal have en størrelse, så deres rumfang er ca. en fjerdedel udfyldt af jordprøven.

Der anvendes standardlaboratorieudstyr, herunder følgende:

— til omrystning: mekanisk rystebord eller tilsvarende

— centrifuge (3 000 g) eller filtreringsanordning (med nitratfrit filterpapir)

— instrument til nitratanalyse med tilstrækkelig følsomhed og reproducerbarhed.

1.6.2. **Jordtyper og antal heraf**

Der anvendes én enkelt jordtype. Følgende jordkarakteristika anbefales:

— sandindhold: mindst 50 % og ikke over 75 %

— pH: 5,5-7,5

— organisk kulstofindhold: 0,5-1,5 %

— den mikrobielle biomasse skal måles (8)(9), og dens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold.

I de fleste tilfælde vil en jord med sådanne egenskaber repræsentere den værst tænkelige situation, da prøvestoffets adsorption er minimal og dets tilgængelighed for mikrofloraen maksimal. Sædvanligvis behøver man derfor ikke udføre forsøg med andre jordtyper. Under visse omstændigheder, f.eks. når prøvestoffet hovedsagelig forventes anvendt i bestemte jordtyper som sur skovbundsjord eller når der er tale om elektrostatisk ladede kemiske stoffer, kan det være nødvendigt at anvende en yderligere jordtype.

▼B

1.6.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.6.3.1. *Indsamling*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet. Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, dato for behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder. Til indsamling af jord skal vælges et areal, som kan anvendes gennem længere tid. Egnede er arealer med vedvarende græs, marker med årlig kornhøst (bortset fra majs) eller tæt tilsået grøngødskning. De valgte prøvetagningsarealer må ikke have været behandlet med plantebeskyttelsesmidler i mindst ét år forud for prøvetagningen. Endvidere må der ikke have været anvendt organisk gødning inden for de sidste seks måneder. Anvendelse af mineralsk gødning er kun acceptabel, når det sker i overensstemmelse med afgrødens behov, og når jordprøverne tidligst udtages tre måneder efter udbringning af gødningen. Jord, som har været behandlet med kunstgødning med kendt biocid virkning (f.eks calciumeyanamid) bør ikke anvendes.

Prøvetagning bør undgås under eller umiddelbart efter lange perioder (mere end 30 dage) med tørke eller oversvømmelse. Af pløjet jord tages prøver fra en dybde af 0 ned til 20 cm. For græsningsarealer eller andre jordtyper, hvor der ikke pløjes i længere perioder (mindst én vækstsæson), kan den maksimale prøvetagningsdybde være en smule mere end 20 cm (f.eks. ned til 25 cm).

Jordprøverne skal transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at jordens oprindelige egenskaber med sikkerhed ikke ændrer sig nævneværdigt.

1.6.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Er opbevaring i laboratoriet ikke til at undgå, kan jorden opbevares i mørke ved 4 + 2 ºC i indtil tre måneder. Under opbevaringen skal aerobe forhold være sikret. Er jorden indsamlet fra områder, hvor den er frossen mindst tre måneder årligt, kan opbevaring i seks måneder ved minus 18 ºC til minus 22 ºC overvejes. Den mikrobielle biomasse af de opbevarede jordprøver måles før hvert forsøg, og biomassens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold (se 1.6.2).

1.6.4. **Håndtering og klargøring af jordprøver til forsøget**

1.6.4.1. *Præinkubering*

Har jorden været opbevaret (jf. 1.6.3.2), anbefales præinkubering i et tidsrum på mellem 2 og 28 døgn. Under præinkuberingen skal jordens temperatur- og fugtindhold svare til forsøgsbetingelserne (se 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fysisk-kemiske egenskaber*

Jorden befries manuelt for store genstande (f.eks. sten, plantedele osv.) og sies derefter våd uden for megen udtørring til en partikelstørrelse på højst 2 mm. Jordprøvens fugtindhold justeres ved hjælp af destilleret eller demineraliseret vand til en værdi mellem 40 % og 60 % af den maksimale vandholdende evne.

1.6.4.3. *Forbedring med organisk substrat*

Jorden skal forbedres med et passende organisk substrat, f.eks. finmalet lucernegræs-grønmel (hovedkomponent: Medicago saliva) med etC/N-forhold mellem 12/1 og 16/1. Det anbefalede lucerne-jord-forhold er 5 g lucerne pr. kilogram jord (tør vægt).

1.6.5. **Klargøring af prøvestoffet til tilføring til jorden**

Prøvestoffet tilføres normalt ved hjælp af et bærestof. Bærestoffet kan være vand (til vandopløselige stoffer) eller et inaktivt fast stof som finkornet kvartssand (partikelstørrelse: 0,1 - 0,5 mm). Man bør undgå andre flydende bærestoffer end vand (f.eks. organiske opløsningsmidler som acetone eller chloroform), da de kan skade mikrofloraen. Anvendes sand som bærestof, kan det coates med prøvestof, som er opløst eller opslæmmet i et passende opløsningsmiddel. I så fald skal opløsningsmidlet fjernes ved fordampning før opblanding med jorden. For at få den bedst mulige fordeling af prøvestoffet i jorden anbefales et forhold på 10 g sand pr. kilogram jord (tør vægt). Kontrolprøver behandles kun med den tilsvarende mængde vand og/eller kvartssand.

Ved test af flygtige kemiske stoffer må tab under behandlingen så vidt muligt undgås, og det må tilstræbes at sikre ensartet fordeling i jorden (f.eks. bør prøvestoffet sprøjtes i jorden i flere punkter).

1.6.6. **Prøvekoncentrationer**

Af landbrugskemikalier skal anvendes mindst to koncentrationer. Den lave koncentration skal afspejle mindst den maksimale mængde, som under praktiske forhold forventes at nå jorden, og den høje koncentration skal være et multiplum af den lave koncentration. Ved beregning af den tilsatte prøvestofkoncentration til jorden forudsættes homogen tilsætning til en dybde af 5 cm og en bulkdensitet af jorden på 1,5. For landbrugskemikalier, som tilføres jorden direkte, og for kemiske stoffer, for hvilke det kan forudsiges, i hvilken mængde de når jorden, anbefales som prøvekoncentrationer den maksimale forventede eksponeringskoncentration (Predicted Environmental Concentration, PEC) samt fem gange denne koncentration. Stoffer, som forventes tilført jorden flere gange i løbet af én sæson, skal testes ved koncentrationer, som fås ved at gange eksponeringskoncentrationen med det maksimale forventede antal tilførsler. Den højeste testede koncentration må dog ikke svare til mere end ti gange den maksimale mængde ved én tilførsel. Afprøves andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, som danner en kvotientrække. De afprøvede koncentrationer skal dække det område, der er nødvendigt tor at fastlægge $EC_x$-værdierne.

▼B

1.7. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.7.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.7.1.1. *Behandlingsprøver og kontrolprøver*

Ved test af landbrugskemikalier deles jorden i tre portioner med samme vægt. To portioner blandes med bærestof indeholdende produktet, den tredje med bærestof uden produkt (kontrol). Det anbefales at benytte mindst tre gentagelser for både behandlet og ubehandlet jord. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier deles jorden i seks portioner med samme vægt. Fem af prøverne blandes med bærestof indeholdende prøvestof, og den sjette blandes med bærestof uden prøvestof. Der anbefales tre gentagelser for både behandlings- og kontrolgruppe. Der drages omsorg for at sikre ensartet fordeling af prøvestoffet i de behandlede jordprøver. Under blandingen bør komprimering og kugledannelse af jorden undgås.

1.7.1.2 *Inkubering af jordprøver*

Inkubering af jordprøver kan ske på to måder: som bulkprøve af behandlet og ubehandlet jord eller som en række lige store delprøver af hver behandlet og ubehandlet jord. Ved test af flygtige prøvestoffer må forsøget dog kun udføres med en række særskilte delprøver. Når jorden inkuberes som bulkprøve, tilberedes store mængder af hver behandlet og ubehandlet jord, og under forsøget udtages efter behov delprøver til analyse. Hvor stor en mængde, som fra begyndelsen skal klargøres til hver behandlings-og kontrolprøve, afhænger af antal delprøver, antal gentagelser af analyserne og det forventede maksimale antal prøvetagningstidspunkter. Når jorden inkuberes som bulkprøve, skal den blandes grundigt før udtagning af delprøver. Når jorden inkuberes som en række særskilte jordprøver, skal hver behandlet og ubehandlet bulkjord deles i det nødvendige antal delprøver, og disse anvendes efter behov, Forventes flere end to prøvetagningstidspunkter i forsøget, tilberedes så mange delprøver, at de rækker til alle gentagelser og alle prøvetagningstidspunkter. Der inkuberes mindst tredobbelte prøver af prøvejorden under aerobe betingelser (se 1.7.1,1). Til alle forsøg skal anvendes passende beholdere med tilstrækkeligt headspace til at undgå opståen af anaerobe betingelser. Ved test af flygtige prøvestoffer udføres forsøget kun med en række særskilte delprøver.

1.7.1.3. *Prøvningsbetingelser og forsøgsvarighed*

Forsøget udføres i mørke ved en rumtemperatur på 20 ± 2 ºC, Under forsøget holdes prøvens fugtindhold på en værdi svarende til mellem 40 % og 60 % af jordens maksimale vandholdende evne (se 1.6.4.2) med en variation på = 5 %. Efter behov kan tilsættes destilleret, demineraliseret vand.

Forsøgenes mindste varighed er 28 døgn. Ved test af landbrugskemikalier sammenholdes nitratdannelsen i behandlede prøver og kontrolprøver. Hvis forskellen mellem dem på dag 28 er over 25 %, fortsættes forsøget, indtil forskellen mellem dem er 25 % eller derunder, dog højst i 100 dage. For andre stoffer end landbrugskemikalier ophører forsøget efter 28 dage. På dag 28 bestemmes nitratmængden i behandlede prøver og kontrolprøver, og $EC_x$-værdierne beregnes.

▼B

1.7.2. **Prøvetagningsplan for analyse af jord**

1.7.2.1. *Prøvetagningsplan for jordprøver*

Ved test af landbrugskemikalier analyseres jordprøverne for nitrat på dag 0, 7, 14 og 28. Er det nødvendigt at forlænge forsøget, fortsættes målingerne efter dag 28 med 14 dages mellemrum.

Testes andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, og jordprøverne analyseres for nitrat ved eksponeringsperiodens start (dag 0) og slutning (dag 28). En mellemliggende måling, f.eks. dag 7, kan foretages hvis det anses for nødvendigt. Data registreret på dag 28 anvendes til bestemmelse af stoffets $EC_x$-værdi. Om ønsket kan værdierne for kontrolprøverne på dag 0 anvendes som jordens startindhold af nitrat.

1.7.2.2. *Analyse af jordprøver*

Nitratmængden i hver gentagelse for behandlede prøver og kontrolprøver bestemmes ved hvert prøvetagningstidspunkt, Nitratindholdet i jorden ekstraheres ved udrystning med en passende ekstraktionsvæske, f.eks. en 0,1 M kaliumchloridopløsning. Det tilrådes at anvende en mængde KCl-opløsning på 5 ml pr. gram tør jord. For at optimere ekstraktionen bør beholderne med jord og ekstraktionsvæske ikke være mere end halvt fyldte. Blandingerne omrystes ved 150 o./min, i 60 minutter. Blandingerne centrifugeres eller filtreres, og væskefaserene analyseres for nitrat. Partikelfri væskeformige ekstrakter kan opbevares ved 20 ± 5 °C i indtil seks måneder.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Ved test af landbrugskemikalier skal den dannede nitratmængde i hver gentagelse af jordprøven registreres, og gennemsnitsværdien for alle gentagelser angives i tabelform. Kvælstofomdannelsen bedømmes ved egnede og almindeligt anerkendte statistiske metoder (f.eks F-test, 5 % signifikansniveau). Den dannede mængde nitrat angives som mg nitrat/kg tør jord/døgn. Nitratdannelsen ved hver behandling sammenholdes med kontrolprøvens, og den procentuelle afvigelse fra kontrolprøven beregnes.

Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier bestemmes den dannede mængde nitrat for hver gentagelse, og der opstilles en dosis-responskurve til bestemmelse af $EC_x$-værdierne. Den nitratmængde (dvs. mg nitrat/kg tør jord), som er fundet i de behandlede prøver efter 28 døgn, sammenholdes med den, der er bestemt i kontrolprøverne. Af disse data beregnes for hver prøvestofkoncentration hæmningen i procent. Disse procentværdier afsættes mod koncentrationen, og $EC_x$-værdierne beregnes. Desuden bestemmes konfidensgrænser (p = 0,95) for de beregnede $EC_x$-værdier ved hjælp af standardmetoder (10)(l 1)(12).

Prøvestoffer med højt kvælstofindhold kan bidrage til den mængde nitrat, som dannes under forsøget. Hvis disse stoffer testes i høj koncentration (f.eks. stoffer som forventes anvendt til gentagen påførsel), skal passende kontrolprøver indgå i forsøget (dvs. jord med prøvestof, men uden plantemel). Data fra disse kontrolprøver skal indgå i beregningerne af $EC_x$.

▼B

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Når man ved test af landbrugskemikalier finder, at forskellen mellem kvælstofdannelsen i prøver, som er behandlet med den laveste mængde (dvs. den forventede maksimale koncentration), og i kontrolprøven ikke er over 25 % på noget prøvetagningstidspunkt efter dag 28. kan produktet anses for at være uden langtidsvirkning på kvælstofomdannelsen i jord. Ved vurdering af forsøg med andre stoffer end landbrugskemikalier anvendes $EC_{50}$, $EC_{25}$ og/eller $EC_{10}$-værdier.

3. **RAPPORTERING**

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Fuldstændig identifikation af den anvendte jord, med angivelse af:

— stedsbestemmelse for lokaliteten (geografisk bredde og længde)

— historiske oplysninger om arealet (dvs. plantedække, behandling med plantebeskyttelsesmidler, behandling med kunstgødning, uheldsbetinget forurening osv.)

— anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

— prøvetagningsdybde (cm)

— indhold af sand/silt/ler (tør vægt %)

— pH (i vand)

— organisk kulstofindhold (tør vægt %)

— kvælstofindhold (tør vægt %)

— startkoncentration af nitrat (mg nitrat/kg tør vægt)

— kationbytningskapacitet (mmol/kg)

— mikrobiel biomasse, angivet som procent af samlet mængde organisk kulstof

— henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

— udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

— nærmere oplysning om eventuel præinkubering af jorden.

Prøvestof:

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— når det er relevant, data til kemisk identifikation, herunder strukturformel, renhed (dvs., for plantebeskyttelsesprodukter, procentdel aktivt indholdsstof), kvælstofindhold.

Substrat:

— substratets oprindelse

— sammensætning (dvs. lucernemel, lucernegræs-grønmel)

— kulstofindhold, kvælstofindhold (tør vægt %)

— kornstørrelse (mm).

▼B

Forsøgsbetingelser:

— Enkeltheder vedrørende forbedring af jorden med organisk substrat

— det anvendte antal koncentrationer af prøvestoffet og, når det er hensigtsmæssigt, begrundelse for de valgte koncentrationer

— enkeltheder vedrørende tilsætning af prøvestoffet til jorden

— inkubationstemperatur

— jordens vandindhold ved forsøgets start og under forsøget

— metode anvendt ved inkubation af jorden (dvs. som bulk eller som en række særskilte delprøver)

— antal gentagelser

— prøvetagningstidspunkter

— metode anvendt til ekstraktion af nitrat af jorden.

Resultater:

— anvendt analysemetode og udstyr til nitratanalyse

— data i tabelform, bestående af enkeltværdier og gennemsnit for nitratmålingerne

— variation mellem gentagelserne for behandlede prøver og kontrolprøver

— forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

— den procentuelle variation i kvælstofdannelsen ved hvert prøvetagningstidspunkt eller, hvis det er hensigtsmæssigt, $EC_{50}$-værdi med 95 % konfidensgrænse, anden EC-værdi (dvs. $EC_{25}$ eller $EC_{10}$) med konfidensintervaller, og grafisk fremstilling af dosis-responskurve

— statistisk behandling af resultaterne

— alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990), Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. udg., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test, EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. 28. september 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality — Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, 18.-20. januar 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997), Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997), Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour, Pharmacol, and Exper. Then, 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971), Probit Analysis. 3. udg., Cambridge, London og New York.

(12) Finney, D.J. (1978), Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. **JORDMIKROORGANISMER: KULSTOFOMDANNELSESTEST**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 217 (2000).

1.1. INDLEDNING

Den beskrevne metode er en laboratoriemetode til undersøgelse af langtidsvirkningerne på jordmikroorganismers kulstofomdannende aktivitet af enkeltstående eksponering for plantebeskyttelsesmidler og eventuelt også andre kemiske stoffer. Metoden er hovedsagelig baseret på anbefalinger fra Plantebeskyttelsesorganisationen for Europa og Middelhavsområderne (1). Der er endvidere taget hensyn til guidelines fra den tyske Biologische Bundesanstalt (2), den amerikanske miljøstyrelse (3), og SETAC (4). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype, som blev holdt i Belgirate. Italien, i 1995 (5), enedes man om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i denne test, Anbefalingerne for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver er baseret på en ISO-vejledning (6) og på anbefalingerne fra workshoppen i Belgirate.

Ved vurdering af prøvestoffers toksiske egenskaber kan det være nødvendigt at bestemme virkningerne på den mikrobielle aktivitet i jord, f.eks. når der kræves oplysninger om plantebeskyttelsesmidlers potentielle bivirkninger på mikrofloraen i jorden, eller når jordmikroorganismer forventes udsat for andre kemiske stoffer end plantebeskyttelsesmidler. Kulstofomdannelsestesten udføres for at bestemme virkningerne af sådanne kemiske stoffer på mikrofloraen i jorden. Ved test af landbrugskemikalier (f.eks. plantebeskyttelsesmidler, kunstgødning og skovbrugskemikalier) udføres både kulstofomdannelses- og kvælstofomdannelsestest. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier er kvælstofomdannelsestesten tilstrækkelig. Viser sådanne kemiske stoffer sig imidlertid i kvælstofomdannelsestesten at have en $EC_{50}$-værdi i samme område som gængse nitrifikationsinhibitorer (f.eks. nitrapyrin), kan en kulstofomdannelsestest udføres for at skaffe yderligere oplysninger.

Jord består af levende og ikke levende komponenter, som er til stede i komplekse og heterogene blandinger. Mikroorganismer spiller en vigtig rolle i nedbrydning og omdannelse af det organiske stof i frugtbar jord, og mange arter bidrager til flere forskellige aspekter af jordens frugtbarhed. Hvis der gennem længere tid gribes ind i disse biokemiske processer, kan det gribe ind i næringsstofcyklussen, således at jordens frugtbarhed ændrer sig. Kulstof- og kvælstofomdannelse finder sted i al frugtbar jord. Skønt det alt efter jordtypen er forskellige mikrobielle samfund, som er ansvarlige for disse processer, følger omdannelsen i det væsentlige altid samme vej.

▼B

Den her beskrevne forsøgsmetode anvendes til bestemmelse af stoffers langsigtede skadevirkning på kulstofomdannelsesprocessen i jordens aerobe dæklag. Metoden er følsom for ændringer i størrelse og aktivitet af de mikrobielle samfund, som er ansvarlige for kulstofomdannelsen, da den udsætter disse samfund for både kemisk stress og kulstofmangel. Der anvendes en sandet jord med lavt indhold af organisk stof. Jorden behandles med prøvestoffet og inkuberes under betingelser, som giver mulighed for et hurtigt mikrobielt stofskifte. Under disse betingelser udtømmes kilderne til umiddelbart tilgængeligt kulstof i jorden hurtigt. Derved opstår der kulstofmangel, som både forårsager celledød og inducerer dvaletilstand og/eller sporedannelse, Hvis forsøget løber over mere end 28 dage, kan man i kontrolprøver (med ubehandlet jord) følge disse reaktioner som et gradvist tab i metabolisk aktiv mikrobiel biomasse (7). Hvis biomassen i jord, som er udsat for kulstofmangel, under prøvebetingelserne påvirkes af tilstedeværelse af et kemisk stof, vil den ikke nødvendigvis vende tilbage til samme niveau som kontrolprøvens. Forstyrrelser, som på et vilkårligt tidspunkt under prøven er fremkaldt af prøvestoffet, vil således ofte vare ved indtil forsøgets slutning.

De test, som metoden oprindeligt er baseret på, er hovedsagelig udviklet til stoffer, for hvilke den til jorden tilførte mængde er kendt på forhånd. Det er f.eks. tilfældet for plantebeskyttelsesmidler, hvor spredemængden i marken kendes. For landbrugskemikalier er det tilstrækkeligt at teste to doser, som er relevante for den forventede eller forudsete spredemængde. Landbrugskemikalier kan enten testes som aktivt indholdsstof eller som færdigformuleret produkt. Testen er dog ikke begrænset til kemiske stoffer med forudsigelig miljøkoncentration. Ved at fendre dels den tilførte mængde prøvestof til jorden, dels metoden til vurdering af data kan man desuden anvende testen på kemiske stoffer, hvor man ikke kender den mængde, som vil nå jorden. For andre kemiske stoffer end landbrugskemikalier bestemmes virkningen af en række koncentrationer på kulstofomdannelsen. Data fra disse forsøg anvendes til at opstille en dosis-responskurve og beregne værdier af $EC_{x,}$ hvor x er den definerede virkning i %.

1.2. DEFINITIONER

**Kulstofomdannelse,** mikrobiel nedbrydning af organisk stof til kuldioxid som uorganisk slutprodukt.

**$EC_x$ (effektiv koncentration),** den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en x % hæmning af kulstoffets omdannelse til kuldioxid.

**$EC_{50}$ (effektiv mediankoncentration),** den koncentration af prøvestoffet i jord, som medfører en 50 % hæmning af kulstoffets omdannelse til kuldioxid.

1.3. REFERENCESTOFFER

Ingen.

▼B

1.4. FORSØGSMETODENS PRINCIP

Siet jord behandles enten med prøvestoffet eller lades ubehandlet (kontrol). Til test af landbrugskemikalier anbefales mindst to prøvekoncentrationer, som vælges i henhold til den højeste forventede koncentration i marken. Efter inkubation i 0, 7, 14 og 28 døgn blandes prøver af behandlet jord og kontroljord med glucose, og den glucoseinducerede respiration måles gennem 12 timer uden afbrydelse, Respirationshastigheden angives enten som kuldioxidproduktionshastighed (mg kuldioxid/kg tør jord/h) eller som iltforbrugshastighed (mg ilt/kg jord/h). Den gennemsnitlige respirationshastighed i de behandlede jordprøver sammenholdes med kontrolprøvernes, og den procentuelle afvigelse af de behandlede prøver fra kontrolprøverne beregnes. Alle forsøg løber over mindst 28 døgn. Hvis der på dag 28 er mere end 25 % forskel mellem behandlet og ubehandlet jord, fortsættes målingerne med 14 dages intervaller indtil højst 100 dage. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier tilsættes prøvestoffet i en række koncentrationer til jordprøverne, og den glucoseinducerede respirationshastighed (dvs. den gennemsnitlig kuldioxiddannelse eller det gennemsnitlige iltforbrug) måles efter 28 døgn. Resultaterne af forsøg med flere koncentrationer analyseres efter en regressionsmodel, og $EC_x$-værdierne beregnes (dvs. $EC._{50}$, $EC_{25}$ og/eller $EC_{10}$). Jf. definitionerne.

1.5. FORSØGETS VALIDITET

Vurdering af forsøgsresultater med landbrugskemikalier bygger på nogle forholdsvis små forskelle (gennemsnitligt ± 25 %) mellem kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i kontrolprøver og i behandlede jordprøver, hvorfor store variationer i kontrolprøverne kan give forkerte resultater. Afvigelsen mellem gentagne kontrolprøver skal derfor være mindre end ± 15 %.

1.6. BESKRIVELSE AF FORSØGSMETODEN

1.6.1. **Apparatur**

Prøvebeholderne skal være udført i kemisk inaktivt materiale. De skal have passende kapacitet svarende til den metode, der anvendes til inkubation af jordprøverne, dvs. inkubation af den samlede mængde eller som en række særskilte jordprøver (jf. 1.7.1.2). Der skal være draget omsorg både for minimering af vandtabet og udveksling af gasser under forsøget (f.eks. kan prøvebeholderne tildækkes med perforeret polyethylenfolie). Ved test af flygtige stoffer skal anvendes forseglede og gastætte beholdere. Beholderne skal have en størrelse, så jordprøven udfylder ca. en fjerdedel af deres rumfang.

Til bestemmelse af glucoseinduceret respiration skal anvendes inkubationssystemer og apparatur til måling af kuldioxidproduktion eller iltforbrug. Eksempler på sådanne systemer og apparatur findes i litteraturen (8) (9) (10) (11).

1.6.2. **Jordtyper og antal heraf**

Der anvendes én enkelt jordtype. Følgende jordkarakteristika anbefales:

— sandindhold: mindst 50 % og ikke over 75 %

▼B

— pH: 5,5-7,5

— organisk kulstofindhold: 0,5-1,5 %

— den mikrobielle biomasse skal måles (12)(13), og dens kulstof indhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold,

I de fleste tilfælde vil en jord med sådanne egenskaber repræsentere den værst tænkelige situation, da prøvestoffets adsorption er minimeret og dets tilgængelighed for mikrofloraen maksimal. Sædvanligvis behøver man derfor ikke udføre forsøg med andre jordtyper. Under visse omstændigheder, f.eks, når prøvestoffet hovedsagelig forventes anvendt i bestemte jordtyper som sur skovbundsjord eller når der er tale om elektrostatisk ladede kemiske stoffer, kan det være nødvendigt at anvende en yderligere jordtype.

1.6.3. **Indsamling og opbevaring af jordprøver**

1.6.3.1. *Indsamling*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet, Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, dato for behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med organisk gødning og kunstgødning, tilførsler af biologisk materiale og uheldsbetingede forureningsepisoder. Til indsamling af jord skal vælges et areal, som kan anvendes gennem længere tid. Egnede er arealer med vedvarende græs, marker med årlig kornhøst (bortset fra majs) eller tæt tilsået grøngødskning, De valgte prøvetagningsarealer må ikke have været behandlet med plantebeskyttelsesmidler i mindst ét år forud for prøvetagningen. Endvidere må der ikke have været anvendt organisk gødning inden for de sidste seks måneder. Anvendelse af mineralsk gødning er kun acceptabel, når det sker i overensstemmelse med afgrødens behov, og når jordprøverne tidligst udtages tre måneder efter udbringning af gødningen. Jord, som har været behandlet med kunstgødning med kendt biocid virkning (f.eks calciumcyanamid) bør ikke anvendes.

Prøvetagning bør undgås under eller umiddelbart efter lange perioder (mere end 30 dage) med tørke eller oversvømmelse. Af pløjet jord tages prøver fra en dybde af 0 ned til 20 cm. For græsningsarealer eller andre jordtyper, hvor der ikke pløjes i længere perioder (mindst én vækstsæson), kan den maksimale prøvetagningsdybde være en smule mere end 20 cm (f.eks. ned til 25 cm). Jordprøverne skal transporteres i sådanne beholdere og under sådanne temperaturforhold, at jordens oprindelige egenskaber med sikkerhed ikke ændrer sig nævneværdigt,

1.6.3.2. *Opbevaring*

Der bør fortrinsvis anvendes jord, som er frisk optaget fra marken. Er opbevaring i laboratoriet ikke til at undgå, kan jorden opbevares i mørke ved 4 ± 2 °C i indtil tre måneder. Under opbevaringen skal aerobe forhold være sikret. Er jorden indsamlet fra områder, hvor den er frossen mindst tre måneder årligt, kan opbevaring i seks måneder ved minus 18 °C overvejes. Den mikrobielle biomasse af de opbevarede jordprøver måles før hvert forsøg, og biomassens kulstofindhold skal udgøre mindst 1 % af jordens samlede organiske kulstofindhold (se 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Håndtering og klargøring af jordprøver til forsøget**

1.6.4.1. *Præinkubering*

Har jorden været opbevaret (jf. 1.6.4.2 og 1.7.1.3), anbefales præinkubering i et tidsrum på mellem 2 og 28 døgn. Under præinkuberingen skal jordens temperatur- og fugtindhold svare til forsøgsbetingelserne (se 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Fysisk-kemiske egenskaber*

Jorden befries manuelt for store genstande (f.eks. sten, plantedele osv.) og sies derefter våd uden for megen udtørring til en partikelstørrelse på højst 2 mm. Jordprøvens fugtindhold justeres ved hjælp af destilleret eller demineraliseret vand til en værdi mellem 40 % og 60 % af den maksimale vandholdende evne.

1.6.5. **Klargøring af prøvestoffet til tilføring til jorden**

Prøvestoffet tilføres normalt ved hjælp af et bærestof. Bærestoffet kan være vand (til vandopløselige stoffer) eller et inaktivt fast stof som finkornet kvartssand (partikelstørrelse: 0,1-0,5 mm), Man bør undgå andre flydende bærestoffer end vand (f.eks. organiske opløsningsmidler som acetone eller chloroform), da de kan skade mikrofloraen. Anvendes sand som bærestof, kan det coates med prøvestof, som er opløst eller opslæmmet i et passende opløsningsmiddel. I så fald skal opløsningsmidlet fjernes ved fordampning før opblanding med jorden. For at få den bedst mulige fordeling af prøvestoffet i jorden anbefales et forhold på 10 g sand pr. kilogram jord (tør vægt). Kontrolprøver behandles kun med den tilsvarende mængde vand og/eller kvartssand.

Ved test af flygtige kemiske stoffer må tab under behandlingen undgås, og det må tilstræbes at sikre ensartet fordeling i jorden (f.eks. bør prøvestoffet sprøjtes i jorden i flere punkter).

1.6.6. **Prøvekoncentrationer**

Af landbrugskemikalier og andre kemiske stoffer med forudsigelig eksponeringskoncentration testes mindst to koncentrationer. Den lave koncentration skal afspejle mindst den maksimale mængde, som under praktiske forhold forventes at nå jorden, og den høje koncentration skal være et multiplum af den lave koncentration, Ved beregning af den tilsatte prøvestofkoncentration til jorden forudsættes homogen tilsætning til en dybde af 5 cm og en bulkdensitet af jorden på 1,5. For landbrugskemikalier, som tilføres jorden direkte, og for kemiske stoffer, for hvilke det kan forudsiges, i hvilken mængde de vil nå jorden, anbefales som prøvekoncentrationer den forventede eksponeringskoncentration (Predicted Environmental Concentration, PEC) samt fem gange denne koncentration. Stoffer, som forventes tilført jorden flere gange i løbet af én sæson, skal testes ved koncentrationer, som fås ved at gange eksponeringskoncentrationen med det maksimale forventede antal tilførsler, De højeste testede koncentration må dog ikke svare til mere end ti gange den maksimale mængde ved én tilførsel.

Afprøves andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, som danner en kvotientrække, De afprøvede koncentrationer skal dække det område, der er nødvendigt for at fastlægge $EC_x$-værdierne.

▼B

1.7. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.7.1. **Eksponeringsbetingelser**

1.7.1.1. *Behandlingsprøver og kontrolprøver*

Ved test af landbrugskemikalier deles jorden i tre portioner med samme vægt, To portioner blandes med bærestof indeholdende produktet, den tredje med bærestof uden produkt (kontrol), Det anbefales at benytte mindst tre gentagelser for både behandlet og ubehandlet jord. Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier deles jorden i seks portioner med samme vægt. Fem af prøverne blandes med bærestof indeholdende prøvestof, den sjette med bærestof uden prøvestof. Der anbefales tre gentagelser for både behandlings- og kontrolgruppe. Der drages omsorg for at sikre ensartet fordeling af prøvestoffet i de behandlede jordprøver. Under blandingen bør komprimering og kugledannelse af jorden undgås.

1.7.1.2. *Inkubering af jordprøver*

Inkubering af jordprøver kan ske på to måder: som bulkprøve af behandlet og ubehandlet jord eller som en række lige store delprøver af hver behandlet og ubehandlet jord. Ved test af flygtige prøvestoffer må forsøget dog kun udføres med en række særskilte delprøver. Når jorden inkuberes som bulkprøve, tilberedes store mængder af hver behandlet og ubehandlet jord, og under forsøget udtages efter behov delprøver til analyse, Hvor stor en mængde, som fra begyndelsen skal klargøres til hver behandlings-og kontrolprøve, afhænger af antal delprøver, antal gentagelser af analyserne og det forventede maksimale antal prøvetagningstidspunkter. Når jorden inkuberes som bulkprøve, skal den blandes grundigt før udtagning af delprøver. Når jorden inkuberes som en række særskilte jordprøver, skal hver behandlet og ubehandlet bulkjord deles i det nødvendige antal delprøver, og disse anvendes efter behov. Forventes flere end to prøvetagningstidspunkter i forsøget, tilberedes så mange delprøver, at de rækker til alle gentagelser og alle prøvetagningstidspunkter. Der inkuberes mindst tredobbelte prøver af prøvejorden under aerobe betingelser (se 1.7.1.1). Til alle forsøg skal anvendes passende beholdere med tilstrækkeligt headspace til at undgå opståen af anaerobe betingelser, Ved test af flygtige prøvestoffer udføres forsøget kun med en række særskilte delprøver.

1.7.1.3. *Prøvningsbetingelser og forsøgsvarighed*

Forsøget udføres i mørke ved en rumtemperatur på 20 ± 2 °C. Under forsøget holdes prøvens fugtindhold på en værdi svarende til mellem 40 % og 60 % af jordens maksimale vandholdende evne (se 1.6.4.2) med en variation på ± 5 %. Efter behov kan tilsættes destilleret, demineraliseret vand.

Forsøgenes mindste varighed er 28 døgn, Ved test af landbrugskemikalier sammenholdes kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i behandlede prøver og kontrolprøver. Hvis forskellen mellem dem på dag 28 er over 25 %, fortsættes forsøget, indtil forskellen mellem dem er 25 % eller derunder, dog højst i i 100 dage. For andre stoffer end landbrugskemikalier ophører forsøget efter 28 dage. På dag 28 bestemmes kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i behandlede prøver og kontrolprøver, og $EC_x$-værdierne beregnes.

▼B

1.7.2. **Prøvetagning og analyse af jord**

1.7.2.1. *Prøvetagningsplan for jordprøver*

Ved test af landbrugskemikalier analyseres jordprøverne for glucoseinduceret respirationshastighed på dag 0, 7, 14 og 28. Er det nødvendigt at forlænge forsøget, fortsættes målingerne efter dag 28 med 14 dages mellemrum.

Testes andre stoffer end landbrugskemikalier, skal der anvendes mindst fem koncentrationer, og jordprøverne analyseres for glucoseinduceret respirationshastighed ved eksponeringsperiodens start (dag 0) og slutning (dag 28). En mellemliggende måling, f.eks. på dag 7, kan foretages, hvis det anses for nødvendigt. Data registreret på dag 28 anvendes til bestemmelse af stoffets $EC_x$-værdi. Om ønsket kan dag 0-værdierne for kontrolprøveme anvendes som startværdier for mængden af metabolisk aktiv biomasse i jorden (12).

1.7.2.2. *Måling af glucoseinduceret respirationshastighed*

Den glucoseinducerede respirationshastighed i hver gentagelse for behandlede prøver og kontrolprøver bestemmes ved hvert prøvetagningstidspunkt. Jordprøverne blandes med en tilstrækkelig mængde glucose til at udløse øjeblikkelig maksimal respiratorisk respons. De nødvendige mængde glucose til fremkaldelse af maksimal respiratorisk respons fra en given jord kan bestemmes i en indledende test, hvor der bruges en række glucosekoncentrationer (14). For sandjord med 0,5-1,5 % organisk kulstof er 2 000 mg til 4 000 mg glucose pr, kg tør jord dog sædvanligvis tilstrækkeligt. Glucosen kan finmales med rent kvartssand (10 g sand/kg tør jord) og iblandes homogent i jorden.

De glucoseforbedrede jordprøver inkuberes i et passende apparat med henblik på måling af respirationshastighed enten kontinuerligt, hver time eller hver anden time (se 1.6.1) ved 20 ± 2 °C. Den afgivne kuldioxid eller den forbrugte ilt måles i 12 timer uden afbrydelse, og målingen begynder snarest muligt, dvs. inden for en til to timer efter glucosetilsætningen. Den samlede kuldioxidproduktion eller det samlede iltforbrug i løbet af de 12 timer måles, og den gennemsnitlige respirationshastighed bestemmes.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Ved test af landbrugskemikalier registreres kuldioxidafgivelse eller iltforbrug i hver gentagelse af jordprøven, og gennemsnitsværdien for alle gentagelser angives i tabelform. Resultaterne bedømmes ved egnede og almindeligt anerkendte statistiske metoder (f.eks F-test, 5 % signifikansniveau). Den glucoseinducerede respirationshastighed angives i mg kuldioxid/kg tør jord/h eller mg ilt/kg tør jord/h. Den gennemsnitlige kuldioxidproduktionshastighed eller iltforbrugshastighed for hver behandling sammenholdes med kontrolprøvens, og den procentuelle afvigelse fra kontrolprøven beregnes.

▼B

Ved test af andre stoffer end landbrugskemikalier bestemmes kuldioxidproduktion eller iltforbrug for hver gentagelse, og der opstilles en dosis-responskurve til bestemmelse af $EC_x$-værdierne. Den glucoseinducerede respirationshastighed (dvs. mg kuldioxid/kg tør jord/h eller mg ilt/kg tør jord/h), som findes i de behandlede prøver efter 28 dage, sammenholdes med kontrolprøvernes. Af disse data beregnes hæmningen i procent for hver prøvestofkoncentration. Disse procentværdier afsættes mod koncentrationen, og $EC_x$-værdierne beregnes ved hjælp af statistiske metoder. Desuden bestemmes konfidensgrænser (p = 0,95) for de beregnede $EC_x$værdier ved hjælp af standardmetoder (15)(16)(17).

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Når man ved test af landbrugskemikalier finder, at forskellen mellem respirationshastigheden i prøver behandlet med den laveste mængde (dvs. den forventede maksimale koncentration) og i kontrolprøve ikke er over 25 % på noget prøvetagningstidspunkt efter dag 28, kan produktet anses for at være uden langtidsvirkning på kulstofomdannelsen i jord. Ved vurdering af forsøg med andre stoffer end landbrugskemikalier anvendes $EC_{50}$, $EC_{25}$ og/eller $EC_{10}$-værdier.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Fuldstændig identifikation af den anvendte jord, med angivelse af:

— stedsbestemmelse for lokaliteten (geografisk bredde og længde)

— historiske oplysninger om arealet (dvs. plantedække, behandlinger med plantebeskyttelsesmidler, behandlinger med kunstgødning, uheldsbetinget forurening osv.)

— anvendelsesmønster (f.eks. landbrugsjord, skov osv.)

— prøvetagningsdybde (cm)

— indhold af sand/silt/ler (tør vægt %)

— pH (i vand)

— organisk kulstofindhold (tør vægt %)

— kvælstofindhold (tør vægt %)

— kationbytningskapacitet (mmol/kg)

— mikrobiel biomasse, angivet som procent af samlet mængde organisk kulstof

— henvisninger, som angiver de metoder, der er anvendt til bestemmelse af hver parameter

— udtømmende oplysninger om indsamling og opbevaring af jordprøver

— nærmere oplysning om eventuel præinkubering af jorden.

▼B

Prøvestof:

— fysisk form og. når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— når det er relevant, data til kemisk identifikation, herunder strukturformel, renhed (dvs, for plantebeskyttelsesprodukter procentdel aktivt indholdsstof), kvælstofindhold.

Forsøgsbetingelser:

— enkeltheder vedrørende forbedring af jorden med organisk substrat

— det anvendte antal koncentrationer af prøvestoffet og, når, det er hensigtsmæssigt, begrundelse for de valgte koncentrationer

— enkeltheder vedrørende tilsætning af prøvestoffet til jorden

— inkubationstemperatur

— jordens vandindhold ved forsøgets start og under forsøget

— metode anvendt ved inkubation af jorden (dvs. som bulk eller som en række særskilte delprøver)

— antal gentagelser

— prøvetagningstidspunkter.

Resultater:

— metode og udstyr anvendt til måling af respiratiunshastighed

— data opstillet som tabeller over enkeltværdier og gennemsnit af kuldioxid- eller oxygenmængden

— variation mellem gentagelserne for behandlede prøver og kontrolprøver

— forklaring af eventuelle korrektioner foretaget i beregningerne

— den procentuelle variation i den glucoseinducerede respirationshastighed ved hvert prøvetagningstidspunkt eller, i givet fald, $EC_{50}$-værdi med 95 % konfidensgrænse, anden $EC_x$-værdi (dvs. $EC_{25}$ eller $EC_{10}$) med konfidensintervaller, og grafisk fremstilling af dosis-responskurve

— når det er hensigtsmæssigt, statistisk behandling af resultaterne

— alle oplysninger og bemærkninger, som kan være til hjælp ved fortolkning af resultaterne.

4. **HENVISNINGER**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2. udg., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule, 28. september 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italien, 18-20. januar 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson. J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in »Pesticide Effects on Soil Microflora«. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Kap. 3: 45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in »Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties«. Agronomy Monograph Nº 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G, (1989), Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass —Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P, (1986), Einfluβ von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide, (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949), A simplified method of evaluating dose-effect experiments, Jour, Pharmacol, and Exper.Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3. udg., Cambridge, London og New York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I JORD**

1. **METODE**

Metoden er gengivet efter OECD TG 307 (2002)

1.1. INDLEDNING

Denne forsøgsmetode er baseret på eksisterende guidelines (1)(2)(3)-(4)(5)(6)(7)(8)(9). Den her beskrevne metode er til brug ved undersøgelse af kemiske stoffers aerobe og anaerobe omdannelse i jord. Ved forsøgene bestemmes i) prøvestoffets omdannelseshastighed og ii) art, dannelseshastighed og nedbrydningshastighed af de omdannelsesprodukter, som planter og jordorganismer kan blive udsat for. Sådanne undersøgelser er nødvendige for kemiske stoffer, som tilføres jorden direkte eller må forventes at nå frem til jordmiljøet. Resultaterne af sådanne laboratorieforsøg kan desuden anvendes til at opstille protokoller for prøvetagning og analyse i tilknyttede markundersøgelser.

Til vurdering af omdannelsesveje er aerobe og anaerobe forsøg med én jordtype sædvanligvis tilstrækkelige (8)(10)(11). Omdannelseshastigheden skal bestemmes i mindst tre yderligere jordtyper (8)(10).

På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype i Belgirate, Italien, i 1995 (10) enedes man specielt om antal og art af de jordtyper, som skal anvendes i dette forsøg. De testede jordtyper skal være repræsentative for de miljøforhold, hvor stoffet skal anvendes eller vil blive udledt. For eksempel skal kemiske stoffer, som kan blive udledt i subtropisk til tropisk klima, testes med Ferrasoler eller Nitosoler (FAO-systemet). Workshoppen resulterede desuden i anbefalinger for indsamling, håndtering og opbevaring af jordprøver, baseret på ISO-vejledningen (15). Anvendelse af overrislet jord (til risdyrkning) er ligeledes tilgodeset i metoden.

1.2. DEFINITIONER

**Prøvestof**: et vilkårligt stof, som enten er moderstof eller et relevant omdannelsesprodukt.

**Omdannelsesprodukter:** alle stoffer, som dannes ved biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffet, herunder $CO_3$ og stoffer, som er til stede i bundne rester.

**Bundne rester:**»Bundne rester« repræsenterer de stoffer i jord, planter eller dyr, som efter ekstraktion bliver tilbage i den pågældende matrix, enten som moderstof eller som metabolitter/omdannelsesprodukter. Ekstraktionsmetoden må ikke bevirke væsentlige ændringer af selve stofferne eller af matrixens struktur. Bindingens art kan delvis klarlægges gennem matrixomdannende ekstraktionsmetoder og avancerede analyseteknikker. Indtil nu har man på denne måde identificeret kovalente bindinger, ionbindinger og sorptionsbindinger foruden indlejring. Sædvanligvis vil dannelse af bundne rester indebære væsentligt nedsat fysiologisk opløselighed (bioaccessibility) og biotilgængelighed (bioavailability) (12) (ændret efter IUPAC 1984 (13)).

**Aerob omdannelse:** reaktioner, som finder sted i tilstedeværelse af molekylært oxygen (14).

▼B

**Anaerob omdannelse:** reaktioner, som finder sted i fravær af molekylært oxygen (14).

**Jord:** en blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold og bebos af små organismer (hovedsagelig mikroskopiske). Jord kan håndteres i to tilstande:

a) uforstyrret, som den har udviklet sig med tiden, i karakteristiske lag af forskellige jordtyper

b) forstyrret, således som den sædvanligvis findes i agerjord eller når der opgraves prøver til anvendelse i denne forsøgsmetode (14).

**Mineralisering:** fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til $CO_2$ og $H_2O$ under aerobe betingelser, og til $CH_4$, $CO_2$ og $H_2O$ under anaerobe betingelser. Når der i denne forsøgsmetode anvendes $^{14}C$-mærkede forbindelser, forstås ved mineralisering en omfattende nedbrydning, hvorunder et mærket kulstof atom oxideres under frigivelse af den pågældende mængde $^{14}CO_2$ (14).

**Halveringstid:** $t_{0,5}$ er den tid, der forløber, til et prøvestof er 50 % omdannet, når omdannelsen kan beskrives ved første ordens kinetik; den er koncentrationsuafhængig.

**$DT_{50}$ (Disappearance Time 50):** den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 50 %: følger omdannelsen ikke første ordens kinetik, er $DT_{50}$ forskellig fra halveringstiden $t_{0,5}$.

**$DT_{75}$ (Disappearance Time 75):** den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 75 %.

**$DT_{90}$ (Disappearance Time 90):** den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 90 %.

1.3. REFERENCESTOFFER

Der skal anvendes referencestoffer til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter med spektroskopiske og/eller kromatografiske metoder.

1.4. FORSØGSMETODENS ANVENDELIGHED

Forsøgsmetoden kan anvendes på alle kemiske stoffer (umærkede eller radioaktivt mærkede), for hvilke man råder over en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Metoden er anvendelig på tungflygtige, ikke-flygtige, vandopløselige og vanduopløselige forbindelser. Metoden bør ikke anvendes på kemikalier, som er letflygtige fra jord (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke vil forblive i jorden under de her beskrevne forsøgsbetingelser.

▼B

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af omdannelseshastigheden kan anvendes mærket eller umærket prøvestof. Til undersøgelse af omdannelsesveje og opstilling af massebalance skal anvendes mærket stof. $^{14}C$-mærkning anbefales, men andre isotoper, f.eks. $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$ og $^{32}P$ kan også anvendes. Mærket skal så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e) ([1]). Prøvestoffets renhed skal være mindst 95 %.

Før man foretager forsøg med aerob og anaerob omdannelse i jord, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (metode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (metode A.4) og Henrys konstant

d) n-oktanol/vand fordelingskoefficient (metode A.8)

e) kemisk stabilitet i mørke (hydrolyse) (metode C.7)

f) $pK_a$, hvis molekylet er tilbøjeligt til at protoneres eller deprotoneres (OECD Guideline 112) (16).

Af andre nyttige oplysninger kan nævnes data vedrørende prøvestoffet toksicitet over for jordmikroorganismer (prøvemetode C.21 og C.22) (16).

Der skal foreligge analysemetoder (herunder metoder til ekstraktion og oprensning) til kvantificering og identifikation af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter.

1.6. METODENS PRINCIP

Jordprøverne behandles med prøvestoffet og inkuberes i mørke i biometerkolber eller i gennemstrømningssystemer under kontrollerede laboratoriebetingelser (ved konstant temperatur og jordfugtighed). Efter passende tidsintervaller ekstraheres jordprøverne og analyseres for moderstof og omdannelsesprodukter. Flygtige produkter indsamles ligeledes til analyse ved hjælp af passende adsorptionsanordninger. Ved at benytte $^{14}C$-mærket stof kan de forskellige mineraliseringshastigheder af prøvestoffet måles gennem opsamling af den udviklede $^{14}CO_2$ og opstilling af en massebalance indbefattende dannelse af jordbundne rester.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfindingsgrad**

Ved ekstraktion og analyse af i det mindste dobbelte jordprøver umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet fås et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er blevet tilført. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer, Genfindingsgraden skal være mellem 90 % og 110 % for mærkede kemiske stoffer (8) og mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer (3).

([1]) Indeholder prøvestoffet f.eks. én ring, skal denne ring være mærket; indeholder prøvestoffet to eller flere ringe, kan separate forsøg være påkrævet for at undersøge, hvad der sker med de enkelte mærkede ringe, og for at skaffe anvendelige oplysninger om dannelse af omdannelsesprodukter.

▼B

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (heri ikke medregnet udvindingsgraden ved den indledende ekstraktion) til kvantitativ bestemmelse af prøvestof og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse på den samme ekstrakt af jord, som er inkuberet tilstrækkelig længe til at dannelse af omdannelsesprodukter har fundet sted.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukteme må ikke være over 0,01 mg-kg$^{-1}$ jord (som prøvestof), og ikke over 1 % af den tilsatte mængde. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal ligeledes angives.

1.7.3. **Nøjagtighed af omdannelsesdata**

Gennem regressionsanalyse på bestemmelserne af prøvestoffets koncentration som funktion af tiden fås de nødvendige oplysninger om omdannelseskurvens pålidelighed og mulighed for at bestemme konfidensgrænser for halveringstiderne (for pseudo første ordens kinetik) eller $DT_{50}$-værdier og, i givet fald, $DT_{75}$- og $DT_{90}$-værdier.

1.8. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.8.1. **Udstyr og kemiske reagenser**

Som inkuberingssystem anvendes statiske lukkede systemer eller egnede gennemstrømningssystemer (7)(17). Eksempler på egnede gennemstrømningsapparater til jordinkubering og biometerkolber er vist i hhv. figur 1 og 2. Hver type inkuberingssystem har sine fordele og begrænsninger (7)(17).

Der kræves standardlaboratorieudstyr, specielt følgende:

— Apparater til GLC, HPLC og TLC med passende detektionssystemer til analyse af radioaktivt mærkede eller umærkede stoffer eller til omvendt isotopfortyndingsmetode

— Instrumenter til identifikation (f.eks. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR osv.)

— Væskescintillationstæller

— Ovn til forbrænding af radioaktivt materiale

— Centrifuge

— Ekstraktionsapparat (f.eks, centrifugeglas til kold ekstraktion og Soxhlet-apparat til kontinuerlig ekstraktion med recirkulation);

— Udstyr til koncentrering af opløsninger og ekstrakter (f.eks. rotationsfordamper)

— Vandbad

— Mekanisk blandemaskine (f.eks, æltemaskine, rotationsmixer).

▼B

Anvendte kemiske reagenser kan f.eks. omfatte:

— NaOH, analytisk kvalitet. 2 $mol.dm^{-3}$, eller anden egnet base (f.eks. KOH, ethanolamin)

— $H_2SO_4$, analytisk kvalitet, 0,05 $mol.dm^{-3}$

— Ethylenglycol, analytisk kvalitet

— Faste absorbenter som natronkalk og polyurethancylindre

— Organiske opløsningsmidler af analytisk kvalitet, f.eks. acetone, methanol osv.

— Scintillationsvæske.

1.8.2. **Tilsætning af prøvestof**

Med henblik på tilsætning til jorden og fordeling heri kan prøvestoffet opløses i vand (demineraliseret eller destilleret) eller, når det er nødvendigt, i mindst mulige mængder acetone eller andre organiske opløsningsmidler (6), hvori prøvestoffet er tilstrækkelig opløseligt og stabilt. Det valgte opløsningsmiddel må imidlertid i den anvendte mængde ikke have væsentlig indflydelse på den mikrobielle aktivitet i jorden (jf. 1.5 og 1.9.2-1.9.3). Man bør undgå opløsningsmidler som virker hæmmende på den mikrobiologiske aktivitet, således chloroform, dichlormethan og andre halogenerede opløsningsmidler.

Prøvestoffet kan også tilsættes i fast form. f.eks. blandet i kvartssand (6) eller i en lille delprøve af prøvejorden, som er lufttørret og steriliseret. Tilsættes prøvestoffet ved hjælp af et opløsningsmiddel, skal man lade opløsningsmidlet fordampe før tilsætning af den spikede delprøve til den oprindelige usterile jordprøve.

For sædvanlige kemikalier, hvis hovedtilførselsvej til jord er gennem kloakslam/landbrug, tilsætter man først prøvestoffet til slammet, som derefter tilsættes til jordprøven. (jf. 1.9.2 og 1.9.3).

Det kan ikke anbefales at bruge formulerede produkter rutinemæssigt, For prøvestoffer med ringe opløselighed kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

1.8.3. **Jordtyper**

1.8.3.1. *Valg af jordtype*

Til fastlæggelse af omdannelsesvejen kan anvendes en repræsentativ jordtype; en sandblandet lerjord (sandy loam), siltblandet lerjord (silty loam), lerjord (loam) eller en lerblandet sandjord (loamy sand) (i henhold til FAO's og USDA's klassifikation (18)) med pH 5,5 - 8,0, organisk kulstofindhold 0,5 - 2,5 % og en mikrobiel biomasse på mindst 1 % af det totale organiske kulstofindhold anbefales (10).

Til undersøgelser af omdannelseshastigheden skal anvendes mindst tre yderligere jordtyper, som repræsenterer et udsnit af relevante jordtyper. Jordtyperne skal være forskellige hvad angår organisk kulstofindhold, pH, lerindhold og mikrobiel biomasse (10).

▼B

Alle jordtyper skal i det mindste være karakteriseret med hensyn til tekstur ( % sand, % silt, % ler) (i henhold til FAO's og USDA's klassifikation (18)), pH, kationbytterkapacitet, organisk kulstofindhold, bulkdensitet og vandretentionsegenskaber ([1]) og mikrobiel biomasse (kun ved aerobe undersøgelser). Til fortolkning af resultaterne kan nærmere oplysninger om jordens egenskaber være nyttige, Til bestemmelse af jordegenskaber kan anvendes de metoder, som anbefales i henvisning (19)(20)(21)(22)(23). Til bestemmelse af mikrobiel biomasse anvendes SIR-metoden (substratinduceret respiration) (25)(26) eller alternative metoder (20).

1.8.3.2. *Indsamling, håndtering og opbevaring af jord*

Der skal foreligge detaljerede historiske oplysninger om det markareal, hvorfra prøvejorden er indsamlet. Disse oplysninger skal omfatte nøjagtig beliggenhed, plantedække, behandling med kemiske stoffer, behandling med organisk gødning og kunstgødning, tilførsel af biologisk materiale og anden forurening. Har jorden inden for de foregående fire år været behandlet med prøvestoffet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, må den ikke anvendes til omdannelsesundersøgelserne (10)(15).

Jorden skal være frisk indsamlet fra marken (fra A-horisonten eller det øverste 20 cm lag) med et indhold af jordvand, som letter sigtning. For andre jordtyper end jord fra overrislede marker bør man undgå prøvetagning under eller umiddelbart efter lange perioder (> 30 dage) med tørke, frysning eller oversvømmelse (14). Prøverne skal transporteres på en måde, som bevirker mindst mulig ændring i vandindholdet og skal opbevares mørkt med så fri adgang for luften som muligt. Hertil er en løst snøret polyethylenpose sædvanligvis velegnet.

Jorden skal behandles snarest muligt efter prøveindsamlingen. Vegetation, større jordfaunadele og sten fjernes, før jorden sigtes gennem en 2 mm si, som fjerner småsten, fauna- og planterester. Omfattende tørring og formaling af jorden før sigtning bør undgås (15).

Når prøvetagning i marken er vanskelig (jorden frossen eller snedækket), kan prøven tages fra jord, som opbevares i drivhus under plantedække (f.eks. græs eller græs/kløver). Undersøgelser med frisk indsamlet jord fra marken må stærkt foretrækkes, men skal den indsamlede og behandlede jord opbevares, før forsøget påbegyndes, må det ske under passende betingelser og i begrænset tidsrum (4-2 °C i højst 3 måneder) for at bevare den mikrobielle aktivitet ([2]). Detaljerede anvisninger for indsamling, håndtering og opbevaring af jord til anvendelse i bioomdannelsesforsøg kan findes i (8)(10)(15)-(26)(27).

([1]) En jordtypes vandretentionsegenskaber kan måles som markkapacitet, vandkapacitet eller vandets sugetension (pF-værdi). Forklaringer findes i bilag 1. I prøverapporten angives, om jordtypernes vandretentionsegenskaber og bulkdensitet er bestemt i uforstyrrede markprøver eller i forstyrrede (behandlede) prøver.

([2]) Nyere forskningsresultater viser, at jord fra tempererede zoner ligeledes kan opbevares ved - 20 °C i over tre måneder (28)(29) uden nævneværdigt tab i mikrobiel aktivitet.

▼B

Før den behandlede jord anvendes til dette forsøg, skal den præinkuberes for at kimene kan bringes til spiring og fjernes, og for at ligevægten i den mikrobielle metabolisme kan genetableres efter skiftet fra prøvetagnings- eller opbevaringsbetingelser til inkubationsbetingelser. Sædvanligvis vil en præinkubationseriode på mellem 2 og 28 døgn under tilnærmelsesvis samme temperatur- og fugtighedsbetingelser som under det faktiske forsøg være tilstrækkelig (15). Opbevarings- og præinkubationsperioden må tilsammen ikke være over tre måneder.

1.9. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.9.1. **Forsøgsbetingelser**

1.9.1.1. *Forsøgstemperatur*

I hele forsøgsperioden skal jordprøverne inkuberes i mørke ved en konstant temperatur, som er repræsentativ for de klimabetingelser, hvorunder benyttelse eller udledning vil finde sted. En temperatur på 20 ± 2 °C anbefales for alle prøvestoffer, som kan tilføres jorden i tempereret klima. Temperaturen skal kontrolleres.

For kemikalier, som tilføres eller udledes under koldere klimaforhold (f.eks. i nordlige lande og i efterårs- og vinterperioden) bør yderligere jordprøver desuden inkuberes ved lavere temperatur (f.eks. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Fugtindhold*

Ved omdannelsesforsøg under aerobe forhold skal jordens fugtindhold ([1]) justeres til og holdes på en pF-værdi mellem 2,0 og 2,5 (3). Jordens fugtindhold angives som masseenheder vand pr. masseenhed tør jord og bør regelmæssigt kontrolleres (f.eks. med 2 ugers mellemrum) ved vejning af inkubationskolberne, og vandtabet kompenseres ved tilsætning af vand (helst sterilfiltreret ledningsvand). Ved tilsætning af vand bør vises omhu, så man undgår eller minimerer tab af prøvestof og/eller omdannelsesprodukter ved fordampning og/eller eventuel fotodegradering.

Til omdannelsesforsøg under anaerobe forhold og under betingelser svarende til overrislet mark skal jorden vandmættes ved overrisling.

1.9.1.3. *Aerobe inkubationsbetingelser*

I gennemstrømningssystemer opretholdes aerobe betingelser ved periodisk skylning eller ved kontinuerlig ventilation med befugtet luft. I biometerkolber opretholdes luftskiftet ved diffusion.

1.9.1.4. *Sterile aerobe betingelser*

For at skaffe viden om eventuel abiotisk omdannelse af prøvestoffet kan jordprøverne steriliseres (vedr. sterilisationsmetoder henvises til henvisning (16) og (29)), behandles med sterilt prøvestof (f.eks. med en opløsning tilsat gennem et sterilfilter) og beluftes med befugtet steril luft som beskrevet i 1.9.1.3. For jord fra overrislet mark skal jord og vand steriliseres, og inkubation skal finde sted som beskrevet i 1.9.1.6.

([1]) Jorden må hverken være for våd eller for tør til at opretholde tilstrækkelig luft- og næringsstoftilførsel til jordens mikroflora. Til optimal mikrobiel vækst anbefales et fugtindhold på mellem 40 og 60 % vandholdende evne (WHC) eller fra 0,1 til 0,33 bar (6). Sidstnævnte område svarer til et pF-område på 2,0-2,5. Det typiske fugtindhold i forskellige jordtyper er angivet i bilag 2.

▼B

1.9.1.5. *Anaerobe inkubationsbetingelser*

For at etablere og opretholde anaerobe betingelser skal jorden — efter behandling med prøvestoffet og inkubation under aerobe betingelser i 30 døgn, dog højst én halveringstid eller $DT_{50}$ — vandmættes (et vandlag på 1-3 cm), og inkubationssystemet skylles med en inaktiv gas (f.eks. kvælstof eller argon) ([1]). Forsøgsopstillingen skal gøre det muligt at måle f.eks. pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale og skal omfatte anordninger til indsamling af flygtige produkter. Systemer af biometertypen skal være lukkede for at undgå luftindtrængen ved diffusion.

1.9.1.6. *lnkubationsbetingelser svarende til overrislet mark*

For at undersøge omdannelsen i overrislede rismarker oversvømmes jorden med et vandlag på 1-5 cm, og prøvestoffet tilsættes vandfasen (9). En jorddybde på mindst 5 cm anbefales. Systemet ventileres med luft under aerobe betingelser. Den vandige fases pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale overvåges og registreres. Der kræves en præ-inkubationsperiode på mindst to uger, før omdannelsesundersøgelserne påbegyndes (se 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Forsøgets varighed*

Undersøgelserne af omdannelseshastighed og -vej bør normalt ikke strække sig over mere end 120 dage ([2]) (3)(6)(8), da der herefter må forventes at indtræffe et fald i den mikrobiologiske aktivitet med tiden i et kunstigt laboratoriesystem, som er afskåret fra naturlig fornyelse. Forsøgene kan fortsætte i længere perioder (f.eks. 6 eller 12 måneder), når det er nødvendigt for at beskrive nedbrydning af prøvestof og dannelse og nedbrydning af hovedomdannelsesprodukter (8), Eventuelle længere inkubationsperioder skal begrundes i forsøgsrapporten og skal være ledsaget af målinger af biomasse under og ved slutningen af sådanne perioder.

1.9.2. **Forsøgets udførelse**

50 til 200 g jord (på tør vægtbasis) anbringes i hver inkubationskolbe (se, figur 1 og 2 i bilag 3), og jorden behandles med prøvestoffet efter en af de i 1.8.2 beskrevne metoder. Når der anvendes organiske opløsningsmidler til påføring af prøvestoffet, fjernes disse fra jorden ved fordampning. Jorden blandes derefter grundigt med spatel og/eller ved omrystning af kolben. Finder forsøget sted under betingelser svarende til overrislet mark, skal jord og vand blandes grundigt efter tilsætning af prøvestoffet. Små alikvoter (f.eks. 1 g) af den behandlede jord analyseres for prøvestoffet til kontrol af, at fordelingen er ensartet. En alternativ metode er beskrevet nedenfor.

([1]) Aerobe betingelser er fremherskende i overjord og endda i den underliggende jord, som påvist i et EU-finansieret forskningsprojekt (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils; Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sverige). Anaerobe betingelser kan lejlighedsvis optræde, når jorden er oversvømmet efter kraftig nedbør eller når rismarker overrisles.

([2]) Aerobe undersøgelser kan afsluttes længe inden 120 døgn, forudsat at omdannelse og mineralisering er løbet fuldstændig til ende på det pågældende tidspunkt. Afslutning af forsøget er mulig efter 120 dage eller når mindst 90 % af prøvestoffet er omdannet, men kun hvis der er dannet mindst 5 % $CO_2$.

▼B

Behandlingsmængden skal svare til den højeste i brugsanvisningen anbefalede spredemængde af et planteskyttelsesmiddel, idet dette iblandes homogent til en passende dybde i marken (f.eks. de øverste 10 cm [1] jord). For kemiske stoffer, der tilføres ved bladgødskning eller påføres jorden uden iblanding, vil den mest passende dybde til beregning af den mængde kemisk stof, der skal tilsættes hver kolbe, være 2,5 cm. For kemiske stoffer, som iblandes jorden, er den mest passende dybde den iblandingsdybde, som foreskrives i brugsanvisningen. Generelt gælder, at den den mængde, der skal tilføres af et kemisk stof, bestemmes på grundlag af den mest relevante tilførselsvej; er den vigtigste tilførselsvej således gennem kloakslam, skal stoffet tilsættes slammet i en koncentration, som afspejler den forventede koncentration i slammet, og den til jorden tilsatte mængde slam skal afspejle den normale mængde slam, som landbrugsjord belastes med. Er denne koncentration ikke høj nok til, at hovedomdannelsesprodukterne kan identificeres, kan inkubation af separate jordprøver med en større tilsætningsmængde være nyttig, men man bør undgå mængder så store, at de påvirker jordens mikrobielle funktioner (jf. 1.5 og 1.8.2).

Alternativt kan en større portion (dvs. 1 til 2 kg) jord behandles med prøvestoffet, blandes grundigt i en passende blandemaskine og derefter overføres til inkubationskolberne i små portioner på 50 til 200 g (f.eks. ved hjælp af prøvedelere). Små alikvoter (f.eks. 1 g) af den behandlede jordportion analyseres for prøvestoffet til kontrol af, at fordelingen er ensartet. Denne fremgangsmåde må foretrækkes, da den giver en mere ensartet fordeling af prøvestoffet i jorden.

Desuden skal der inkuberes ubehandlede jordprøver ved samme betingelser (aerobe) som prøver behandlet med prøvestof. Disse prøver anvendes til måling af biomasse under og efter afslutning af forsøgene.

Når prøvestoffet tilføres jorden opløst i et eller flere organiske opløsningsmidler, skal jordprøverne inkuberes med samme mængde opløsningsmiddel (-midler) og ved samme betingelser (aerobe) som prøver behandlet med prøvestof. Disse prøver anvendes til måling af biomasse før, under og efter afslutning af forsøgene for at kontrollere, om opløsningsmidlerne har indvirkning på den mikrobielle biomasse.

Kolberne med behandlet jord tilsluttes enten det i figur 1 beskrevne gennemstrømningssystem eller lukkes med den i figur 2 viste absorptionskolonne (se bilag 3).

---

([1]) Begyndelseskoncentrationen på arealbasis beregnes af følgende udtryk:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

$C_{soil}$ = Begyndelseskoncentrationen i jord ($mg.kg^{-1}$)

A = Spredemængde ($kg.ha^{-1}$); 1 = tykkelse af markjordlaget (m):

d = tør bulkdensitet af jorden ($kg.m^{-3}$).

Som tommelfingerregel resulterer en spredemængde på 1 $kg.ha^{-1}$ i en jordkoncentration på ca. 1 $mg.kg^{-1}$ i et 10 cm tykt lag (idet bulkdensiteten er sat til 1 $g.cm^{-3}$).

▼B

1.9.3. **Prøvetagning og måling**

Ved de respektive tidsintervaller udtages et par inkubationskolber, og jordprøverne ekstraheres med passende opløsningsmidler af forskellig polaritet og analyseres for prøvestof og/eller omdannelsesprodukter. I en veltilrettelagt undersøgelse er der tilstrækkeligt med kolber til, at der kan bruges to kolber ved hver prøvetagning. Endvidere udtages absorptionsopløsninger eller faste absorbenter med forskellige tidsintervaller (i den første måned med 7-døgns intervaller, efter én måned med 17-døgns intervaller) under og efter inkubationen af hver jordprøve og analyseres for flygtige produkter. Derudover skal der indgå jordprøver udtaget direkte efter tilsætning (0-dages prøve) i mindst 5 forskellige prøvetagningspunkter. Tidsintervallerne vælges sådan, at mønsteret for nedbrydning af prøvestoffet og for omdannelsesprodukternes dannelse og nedbrydning kan fastlægges (f.eks. ved 0. 1, 3, 7 dage; 2, 3 uger; 1, 2, 3 måneder osv.).

Når der bruges $^{14}C$-mærket prøvestof, bliver den ikke-ekstraherbare radioaktivitet kvantificeret ved forbrænding, og der opstilles en massebalance for hvert prøvetagningsinterval.

Ved inkubation under anaerobe forhold og med overrisling af jorden kan jord- og vandfasen enten sammen analyseres for prøvestof og omdannelsesprodukter, eller faserne kan adskilles ved filtrering eller centrifugering før ekstraktion og analyse.

1.9.4. **Frivillige prøver**

Det kan være nyttigt at foretage yderligere forsøg under aerobe, ikke-sterile betingelser ved andre temperaturer og jordfugtigheder for at belyse temperaturens og jordfugtighedens indflydelse på omdannelseshastigheden af et prøvestof og/eller dets omdannelsesprodukter i jord.

Yderligere karakterisering af ikke-ekstraherbar radioaktivitet kan søges foretaget f.eks. med superkritisk væskeekstraktion.

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

Mængden af prøvestof, omdannelsesprodukter, flygtige stoffer (kun i %) og ikke ekstraherbart stof angives i % af den tilførte begyndelseskoncentration og, i givet fald, i $mg.kg^{-1}$ jord (på tør vægtbasis) for hvert prøvetagningsinterval. For hvert prøvetagningsinterval opstilles en massebalance i procent af den tilførte begyndelseskoncentration. En grafisk fremstilling af prøvestoffets koncentration mod tiden giver mulighed for bestemmelse af dets omdannelseshalveringstid eller $DT_{50}$. De vigtigste omdannelsesprodukter skal identificeres og deres koncentration ligeledes afbildes grafisk mod tiden for at vise deres dannelses- og nedbrydningshastighed. Ved »vigtigste omdannelsesprodukter« forstås dem, der på noget tidspunkt i løbet af undersøgelsen repræsenterer ≥ 10 % af den tilførte mængde.

De opsamlede flygtige produkter giver et vist fingerpeg om prøvestoffets og omdannelsesprodukterne potentielle flygtighed fra jord.

▼B

Der foretages en mere præcis bestemmelse af halveringstider eller $DT_{50}$-værdier og, i givet fald. $DT_{75}$- og $DT_{90}$-værdier, ved beregning med passende kinetiske modeller. I rapporten angives værdierne af halveringstider og $DT_{50}$ sammen med beskrivelsen af den anvendte model, reaktionsordenen og determinationskoefficienten ($r^2$). Første ordens kinetik antages at være gældende, medmindre $r^2 < 0,7$. Når det er hensigtsmæssigt, anvendes beregningerne også på hoved-omdannelsesprodukterne. Eksempler på passende modeller er beskrevet i henvisning (31) til (35).

For kinetikforsøg ved forskellige temperaturer beskrives omdannelseshastighederne som funktion af temperaturen inden for det eksperimentelle temperaturområde med brug af Arrhenius' ligning i formen:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

hvor ln A og B er regressionskonstanter givet ved henholdsvis skæringspunkt og hældning af den bedst tilnærmede linje dannet ved lineær regression af ln k mod 1/T, idet k er hastighedskonstanten og T temperaturen i Kelvin. Man må være opmærksom på, at Arrchenius-ligningen kun er gyldig inden for et begrænset temperaturområde, når omdannelsen sker ved mikrobiel aktivitet.

2.2. EVALUERING OG FORTOLKNING AF RESULTATER

Skønt forsøgene finder sted i et kunstigt laboratoriesystem, kan man ved hjælp af resultaterne bestemme både prøvestoffets omdannelseshastighed og den hastighed, hvormed omdannelsesprodukterne dannes og nedbrydes under feltbetingelser (36)(37).

Ved at undersøge omdannelsesvejen for et prøvestof får man oplysninger om, hvordan det tilførte stof undergår strukturændringer i jorden gennem kemiske og mikrobielle reaktioner.

3. **RAPPORTERING**

FORSØGSRAPPORT

Forsøgsrapporten skal indeholde følgende:

Prøvestof:

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se 1.5)

— renhed (urenheder) af prøvestoffet

— det mærkede kemiske slofs radiokemiske renhed og, når del er hensigtsmæssigt, specifikke aktivitet

Referencestoffer:

— kemisk navn og struktur for de referencestoffer, som er anvendt til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter

Prøvejordtyper:

— enkeltheder vedrørende indsamlingsstedet

— dato og fremgangsmåde for udtagelse af jordprøven

▼B

— jordtypernes egenskaber, således pH, organisk kulstofindhold, tekstur, ( % sand, % silt, % ler), kationbytterkapacitet bulkdensitet, vandretentionsegenskaber og mikrobiel biomasse

— opbevaringsvarighed og -betingelser (hvis jorden har været opbevaret)

Omstændigheder ved forsøget:

— dato for forsøgenes udførelse

— mængde prøvestof tilført

— anvendte opløsningsmidler og metoden, med hvilken prøvestoffet er tilført

— vægtmængde jord, som indledende er behandlet og hvoraf der er udtaget prøver til analyse med de fastlagte intervaller

— beskrivelse af det anvendte inkubationssystem

— luftgennemstrømningshastigheder (kun for gennemstrømningssystemer)

— temperatur af forsøgsopstillingen

— jordens fugtindhold under inkuberingen

— mikrobiel biomasse før, under og efter aerobe forsøg

— pH, oxygenkoncentration og redoxpotentiale før, under og efter forsøg under anaerobe forhold og med overrislet jord

— ekstraktionsmetode(r)

— metoder til kvantificering og identifikation af prøvestoffet og dets hovedomdannelsesprodukter i jord og absorbenter

— antal gentagelser og antal kontroller

Resultater

— resultat af bestemmelse af mikrobiel aktivitet

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— genfindingsgrad ( % værdier for en gyldig undersøgelse er angivet i 1.7.1)

— tabeller over resultater, angivet som % af den tilførte begyndelsesdosis, og, i givet fald, som mg. $kg^{-1}$ jord (på tør vægtbasis)

— massebalance før, under og efter forsøgene

— beskrivelse af ikke-ekstraherbar (bunden) radioaktivitet eller rester i jord

— kvantificering af udledt $CO_2$ og andre flygtige forbindelser

— kurver over koncentrationen i jord som funktion af tiden, dels for prøvestoffet, dels, i givet fald, for de vigtigste omdannelsesprodukter

— halveringstid eller $DT_{50}$, $DT_{75}$ og $DT_{90}$, dels for prøvestoffet, dels, i givet fald, for de vigtigste omdannelsesprodukter, med angivelse af konfidensgrænser

▼B

— bestemmelse af den abiotiske nedbrydningshastighed under sterile betingelser

— en vurdering af omdannelseskinetikken for prøvestoffet og, i givet fald, hovedomdannelsesprodukterne

— formodede omdannelsesveje, når det er relevant

— diskussion og fortolkning af resultaterne

— rådata (dvs. eksempler på kromatogrammer, eksempler på beregning af omdannelseshastigheder, og anvendte metoder til identifikation af omdannelsesprodukter).

4. **HENVISNINGER**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III. Part A: Fate and Behaviour in the Environment.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling . Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Annex V to Dir. 67/548/EEC.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schaehtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments, In Pesticide Effects on Soil Microflora, L. Somerville. M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment; Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16$^{th}$ Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality. 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996), Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R, (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, DA, Hamaker, J.W., Mcikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In »Environmental Dynamics of Pesticides«. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V, (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II, Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. 1. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci.Technol. 24. 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

*Bilag 1*

**VANDTENSION, MARKKAPACITET OG VANDHOLDENDE EVNE** ([1])

| Højde af vandsøjle [cm] | pF ([a]) | bar ([b]) | Bemærkninger |
|---|---|---|---|
| $10^7$ | 7 | $10^4$ | Tør jord |
| $1{,}6 \cdot 10^4$ | 4,2 | 16 | Visnegrænse |
| $10^4$ | 4 | 10 | |
| $10^3$ | 3 | 1 | |
| $6 \cdot 10^2$ | 2,8 | 0,6 | |
| $3{,}3 \cdot 10^2$ | 2,5 | 0,33 ([c]) | Område for Markkapacitet ([d]) |
| $10^2$ | 2 | 0,1 | |
| 19 | 1,8 | 0,06 | |
| 33 | 1,5 | 0,033 | |
| 10 | 1 | 0,01 | Vandholdende evne (tilnærmet) |
| 1 | 0 | 0,001 | Vandmættet jord |

([a]) pF = logaritmisk angivelse af cm vandsøjle.
([b]) 1 bar = $10^5$ Pa.
([c]) Svarende til et omtrentligt vandindhold på 10 % i sand, 35 % i lerjord og 45 % i ler.
([d]) Markkapaciteten er ikke konstant, men varierer alt efter jordtypen mellem pF 1,5 og 2,5.

*Vandpotentialet* måles i cm vandsøjle eller i bar. På grund af sugetensionens store variationsområde angives denne simpelthen som pF-værdien, som svarer til logaritmen til værdien i cm vandsøjle.

*Markkapaciteten* er den mængde vand. som en naturlig jord kan tilbageholde mod tyngdekraften 2 døgn efter længerevarende regn eller efter tilstrækkelig kunstvanding. Den bestemmes i uforstyrret jord in situ i marken. Målingen er således ikke anvendelig på laboratorieprøver af forstyrret jord. Markkapaciteten bestemt i forstyrret jord kan udvise store systematiske afvigelser.

*Den vandholdende evne* (WHC) bestemmes i laboratoriet med uforstyrret og forstyrret jord ved at mætte en jordsøjle med vand ved kapillartransport. Den er specielt nyttig til forstyrret jord og kan være indtil 30 % større end markkapaciteten (1). Den er endvidere lettere al bestemme eksperimentelt end pålidelige værdier af markkapaciteten.

Noter

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

*Bilag 2*

**FUGTINDHOLD I JORD (G VAND PR. 100 G TØR JORD) FOR FORSKELLIGE JORDTYPER FRA FORSKELLIGE LANDE**

| Jordtype | Land | Fugtindhold i jord ved | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Vandholdende evne (WHC) ([1]) | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Sand | Tyskland | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Lerblandet sand | Tyskland | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Lerblandet sand | Schweiz | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Siltler | Schweiz | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Lerjord | Brasilien | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Lerjord | Japan | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Sandblandet lerjord | Japan | 82,4 | 59,2 | 36,0 |
| Siltler | USA | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Sandblandet lerjord | USA | 40,4 | 25,2 | 13,3 |

([1]) Vandholdende evne.

▼B

*Bilag 3*

*Figur 1*

**Eksempel på gennemstrømningsapparat til undersøgelser af omdannelsen af kemikalier i jord** ([1]) ([2])

1: nåleventil

2: gasvaskeflaske indeholdende vand

3: ultramembran (kun sterile betingelser), porestørrelse 0,2 µm

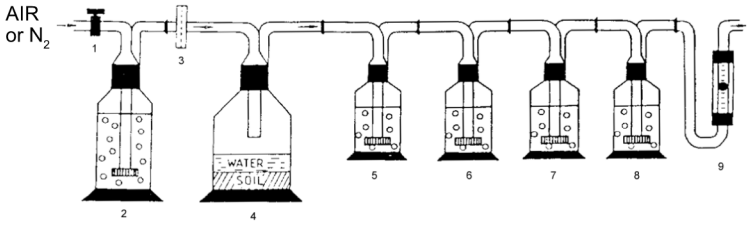
4: kolbe til undersøgelse af jordens metabolisme (kun vandfyldt under anaerobe forhold og i overrislet jord)

5: udskiller med ethylenglycol til flygtige organiske forbindelser

6: udskiller med svovlsyre til flygtige alkaliske forbindelser

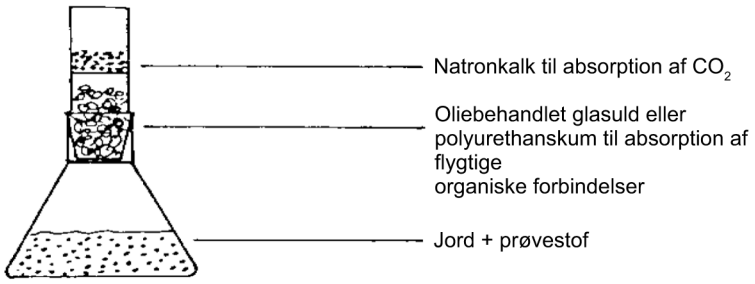
7, 8: udskiller med natriumhydroxid til $CO_2$ og andre flygtige sure stoffer

9: flowmeter




*Figur 2*

**Eksempel på kolbe af biometertypen til undersøgelse af omdannelsen af kemiske stoffer i jord** ([3])




([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (RJ. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B

## C.24. AEROB OG ANAEROB OMDANNELSE I AKVATISKE SEDIMENTSYSTEMER

### 1. METODE

Metoden er gengivet efter OECD TG 308 (2002).

### 1.1. INDLEDNING

Kemiske stoffer kan blive tilført lave eller dybe overfladevande gennem direkte tilledning, spredning af aerosoler, afstrømning, afløb, affaldsbortskaffelse, spildevand fra industri, husholdning eller landbrug samt atmosfærisk deposition. Den her beskrevne laboratoriemetode er bestemt til vurdering af aerob og anaerob omdannelse af organisk-kemiske stoffer i akvatiske sedimentsystemer. Den er baseret på eksisterende Guidelines (1)(2)(3)(4)(5)(6). På en OECD-workshop om valg af jord-/sedimenttype i Belgirate, Italien, i 1995 (7) enedes man specielt om antal og art af de sedimenter, som skal anvendes i dette forsøg. Workshoppen udsendte desuden anbefalinger for indsamling, håndtering og opbevaring af sedimentprøver, baseret på ISO-vejledningen (8). Sådanne undersøgelser er nødvendige for kemiske stoffer, som anvendes direkte i vandmiljøet eller som må påregnes at nå frem til vandmiljøet ad ovennævnte veje.

I naturlige akvatiske sedimentsystemer hersker der ofte aerobe forhold i den øvre vandfase. Det overfladiske sedimentlag kan enten være aerobt eller anaerobt, mens den dybere del af sedimentet sædvanligvis er anaerob. For at tage alle disse muligheder i betragtning beskrives i dette dokument både aerobe og anaerobe forsøg. Det aerobe forsøg simulerer en aerob vandsøjle over et aerobt sedimentlag, som befinder sig over en anaerob gradient. Det anaerobe forsøg simulerer et fuldstændig anaerobt vandsedimentsystem. Hvis omstændighederne gør det nødvendigt at afvige væsentligt fra disse anbefalinger, f.eks. ved at bruge intakte sedimentkerner eller sedimenter, som kan have været udsat for prøvestoffet, foreligger der andre metoder til dette formål (9).

### 1.2. DEFINITIONER

Der skal i alle tilfælde anvendes SI-enheder.

**Prøvestof:** et vilkårligt stof, hvad enten det er moderstof eller et relevant orndannelsesprodukt.

**Omdannelsesprodukter:** alle stoffer, som dannes ved biotisk eller abiotisk omdannelse af prøvestoffer, herunder $CO_2$ og bundne rester.

**Bundne rester:** »Bundne rester« repræsenterer de stoffer i jord, planter eller dyr, som efter ekstraktion persisterer i den pågældende matrix, enten som moderstof eller som metabolitter/omdannelsesprodukter. Ekstraktionsmetoden må ikke bevirke væsentlige ændringer af selve stofferne eller af matrixens struktur. Bindingens art kan delvis klarlægges gennem matrixomdannende ekstraktionsmetoder og avancerede analyseteknikker. Indtil nu er der på denne måde identificeret kovalente bindinger, ionbindinger og sorptionsbindinger foruden indlejring. Sædvanligvis vil dannelse af bundne rester medføre væsentligt nedsat fysiologisk opløselighed (bioaccessibility) og biotilgængetighed (bioavailability) (10) (ændret efter IUPAC 1984 (11)).

▼B

**Aerob omdannelse:** (oxiderende): reaktioner, som finder sted i tilstedeværelse af molekylært oxygen (12).

**Anaerob omdannelse:** reaktioner, som finder sted i fravær af molekylært oxygen (12).

**Naturligt vand:** overfladevande udtaget fra damme, floder, vandløb osv.

**Sediment:** en blanding af mineralske og organisk-kemiske bestanddele, hvoraf sidstnævnte indeholder højmolekylære forbindelser med stort kulstof- og kvælstofindhold, Det afsættes af naturligt vand og danner grænseflade til dette vand.

**Mineralisering;** fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til $CO_2$ og $H_2O$ under aerobe betingelser, og til $CH_4$, $CO_2$ og $H_2O$ under anaerobe betingelser. Når der i forbindelse med denne forsøgsmetode anvendes radioaktivt mærkede forbindelser, forstås ved mineralisering en vidtgående nedbrydning af molekylet, hvorunder et mærket kulstofatom oxideres eller reduceres under frigivelse af den pågældende mængde af henholdsvis $^{14}CO_2$ og $^{14}CH_4$.

**Halveringstid:** $t_{0,5}$ er den tid, der forløber, til et prøvestof er 50 % omdannet, når omdannelsen kan beskrives ved første ordens kinetik; den er uafhængig af begyndelseskoncentrationen.

**$DT_{50}$ (Disappearance Time** 50): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 50 %.

**$DT_{75}$ (Disappearance Time 75):** den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 75 %.

**$DT_{90}$ (Disappearance Time** 90): den tid, der forløber, til koncentrationen af prøvestoffet er aftaget med 90 %.

1.3. REFERENCESTOFFER

Til identifikation og kvantitativ bestemmelse af omdannelsesprodukter med spektroskopiske og kromatografiske metoder skal anvendes referencestoffer.

1.4. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Til måling af omdannelseshastigheden kan anvendes umærket eller isotopmærket prøvestof, men radioaktivt mærket stof må foretrækkes. Til undersøgelse af omdannelsesveje og opstilling af massebalance skal anvendes mærket stof. $^{14}C$-mærkning anbefales, men andre isotoper, f.eks. $^{13}C$, $^{15}N$, H og "P, kan også anvendes. Mærket skal så vidt muligt placeres i molekylets mest stabile del(e) - ([1]). Prøvestoffets kemiske og/eller radiokemiske renhed skal være mindst 95 %.

Før man udfører et forsøg, skal der foreligge følgende oplysninger om prøvestoffet:

a) vandopløselighed (metode A.6)

b) opløselighed i organiske opløsningsmidler

c) damptryk (metode A.4) og Henrys konstant

([1]) Indeholder prøvestoffet f.eks. én ring, skal denne ring være mærket; indeholder prøvestoffet to eller flere ringe, kan separate forsøg være nødvendige for at undersøge de enkelte mærkede ringes skæbne og for at få anvendelige oplysninger om dannelse af omdannelsesprodukter.

▼B

d) n-oktanol/vand fordelingskoefficient (metode A.8)

e) adsorptionskoefficient ($K_d$, $K_f$ eller, i givet fald, $K_{oc}$ (metode C. 18)

f) hydrolyse (metode C.7)

g) syredissociationskonstant ($pK_a$) (OECD Guideline 112) (13)

h) prøvestoffets kemiske struktur og placeringen af eventuel isotopmærkning.

*Bemærkning;* Den temperatur, ved hvilken disse målinger har fundet sted, skal angives.

Af andre nyttige oplysninger kan nævnes data vedrørende prøvestoffet toksicitet over for mikroorganismer, data vedrørende umiddelbar og/eller naturlig bionedbrydelighed og data vedrørende aerob og anaerob omdannelse i jord.

Der skal foreligge analysemetoder (herunder metoder til ekstraktion og oprensning) til identifikation og kvantitativ bestemmelse af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter i vand og i sediment (se 1.7.2).

1.5. FORSØGSMETODENS PRINCIP

I den her beskrevne forsøgsmetode anvendes et aerobt og et anaerobt akvatisk sedimentsystem (se bilag 1), som giver mulighed for:

i) måling af prøvestoffets omdannelseshastighed i et vand-sediment system

ii) måling af prøvestoffets omdannelseshastighed i sedimentet

iii) måling af mineraliseringshastigheden for prøvestoffet og/eller dets omdannelsesprodukter (når der anvendes $^{14}C$-mærket prøvestof)

iv) identifikation og kvantitativ bestemmelse af omdannelsesprodufeter i vand- og sedimentfaser, herunder massebalance (når der anvendes mærket prøvestof)

v) måling af fordelingen af prøvestoffet og dets omdannelsesprodukter mellem de to faser under inkubation i mørke (for at undgå f.eks. algevækst) ved konstant temperatur, Halveringstid. $DT_{50}$, $DT_{75}$ og $DT_{90}$ bestemmes, når data berettiger det, men bør ikke ekstrapoleres ud over forsøgsperioden (se 1.2).

Til både aerobe og anaerobe forsøg kræves mindst to sedimenter og de tilhørende vande (7). I visse tilfælde kan det dog være nødvendigt at anvende flere end to akvatiske sedimenter, f.eks. når det kemiske stof kan optræde i ferskvands- og/eller marint miljø.

▼B

1.6. FORSØGSMETODENS ANVENDELIGHED

Forsøgsmetoden kan anvendes på alle kemiske stoffer (umærkede eller mærkede), til hvilke man råder over en tilstrækkelig nøjagtig og følsom analysemetode. Metoden kan anvendes på tungflygtige, ikke-flygtige, vandopløselige og tungtopløselige forbindelser. Metoden bør ikke anvendes på kemiske stoffer, som er letflygtige fra vand (f.eks. rygningsmidler eller organiske opløsningsmidler) og således ikke vil forblive i vand og/eller sediment under de her beskrevne forsøgsbetingelser.

Metoden er hidtil anvendt til undersøgelse af omdannelsen af kemiske stoffer i ferske vande og sedimenter, men kan i princippet også anvendes på flodmundingssystemer/marine systemer. Den er ikke egnet til simulering af betingelserne i strømmende vand (f.eks floder) eller i det åbne hav.

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfindingsgrad**

Ved ekstraktion og analyse af i det mindste dobbelte vand- og sedimentprøver umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet fås et første fingerpeg om analysemetodens repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er blevet tilført. Genfindingsgraden for senere forsøgsstadier fås af de respektive massebalancer (når der bruges mærket stof). Genfindingsgraden skal være mellem 90 % og 110 % for mærkede kemiske stoffer (6) og mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer.

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (heri ikke medregnet udvindingsgraden ved den indledende ekstraktion) til kvantitativ bestemmelse af prøvestof og omdannelsesprodukter kan kontrolleres ved dobbelt analyse på den samme ekstrakt af vand- eller sedimentprøverne, efter at disse er inkuberet tilstrækkelig længe til, at dannelse af omdannelsesprodukter har fundet sted.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukterne må ikke være over 0,01 mg $kg^{-1}$ i vand eller sediment (som prøvestof) og ikke over 1 % af den startmængde, der er tilsat prøvesystemet. Grænsen for kvantitativ bestemmelse skal angives.

1.7.3. **Nøjagtighed af omdannelsesdata**

Gennem regressionsanalyse på bestemmelserne af prøvestoffets koncentration som funktion af tiden fås relevante oplysninger om omdannelseskurvens nøjagtighed samt mulighed for at fastlægge konfidensgrænser for halveringstiderne (når der gælder pseudo første ordens kinetik) eller $DT_{50}$-værdier, og i givet fald $DT_{75}$- og $DT_{90}$-værdier.

1.8. BESKRIVELSE AF METODEN

1.8.1. **Prøvesystem og apparatur**

Til forsøget skal anvendes glasbeholdere (f.eks. flasker, centrifugeglas), medmindre de indledende data (således n-oktanol-vand fordelingskoefficient, sorptionsdata osv.) viser, at prøvestoffet kan adhærere til glas, i hvilket tilfælde det kan blive nødvendigt at benytte et alternativt materiale (som Teflon). Når prøvestoffet vides at adhærere til glas, kan problemet afhjælpes ved hjælp af eneller flere af følgende metoder:

▼B

— bestemmelser a fden masse prøvestof og omdannelsesprodukter, som sorberes på glas

— vask af alt glasapparatur med opløsningsmiddel ved forsøgets afslutning

— anvendelse af formulerede produkter (se også 1.9.2)

— brug af øget mængde co-solvent ved tilsætning af prøvestof til systemet; anvendes co-solvent, må det ikke bevirke solvolyse af prøvestoffet.

Eksempler på typiske prøveopstillinger, dvs. gennemstrømningssystemer og biometersystemer, er vist i hhv, bilag 2 og 3 (14). Andre anvendelige inkubationssystemer er beskrevet i henvisning (15). Forsøgsopstillingen skal give mulighed for udskiftning af luft eller kvælstof og indsamling af flygtige produkter, Forsøgsopstillingen skal være dimensioneret således, at den opfylder de krav, der stilles af forsøget (jf. 1.9.1). Udluftning kan enten ske ved let gennembobling eller ved at der ledes luft eller kvælstof hen over vandoverfladen. I sidstnævnte tilfælde kan forsigtig omrøring ovenfra være nødvendig for at opnå bedre fordeling af ilt eller kvælstof i vandet, Der må ikke anvendes $CO_2$-fri luft, da det kan medføre stigning i vandets pH. I begge tilfælde bør forstyrrelse af sedimentet så vidt muligt undgås. Tungflygtige kemiske stoffer skal testes i et biometer-system med forsigtig omrøring af vandoverfladen. Lukkede kar med headspace af enten atmosfærisk luft eller kvælstof og indvendige glas til opsamling af flygtige produkter kan ligeledes anvendes (16). Ved den aerobe prøve kræves regelmæssig udskiftning af headspace-gassen for at kompensere for biomassens iltforbrug.

Egnede udskillere til flygtige opsamlingsprodukter kan være, men er ikke begrænset til en 1 M opløsning af kaliumhydroxid eller natriumhydroxid til udskillelse af kuldioxid ([1]) og ethylenglycol, ethanolamtn eller 2 % paraffin i xylen til organiske forbindelser. Flygtige stoffer, som dannes under anaerobe forhold, således methan, kan f.eks, opsamles med molekylsi, Sådanne flygtige stoffer kan f.eks, forbrændes til $CO_2$ ved, at gassen ledes gennem et kvartsrør fyldt med CuO ved en temperatur på 900 ºC, og den dannede $CO_2$ opsamles i en absorber med alkali (17).

Der kræves laboratorieudstyr til kemisk analyse af prøvestoffet og omdannelsesprodukter (f.eks. ved gasvæskekromatografi (GLC), high performance væskekromatografi (HPLC), tyndtlagskromatografi (TLC), massespektroskopi (MS), gaskromatografi-massespektroskopi (GC-MS), væskekromatografi-massespektroskopi (LC-MS), kernemagnetisk resonans (NMR) mv.), herunder detektionssystemer for radioaktivt mærkede eller umærkede kemiske stoffer. Når radioaktivt mærket stof anvendes, skal der desuden bruges en væskescintillationstæller og en forbrændingsovn (til forbrænding af sedimentprøve før analyse af radioaktivitet).

Herudover skal der efter behov bruges øvrigt standardlaboratoneudstyr til fysisk-kemisk og biologisk bestemmelse (se tabel 1, 1.8.2.2), glasapparatur, kemikalier og reagenser.

([1]) Da sådanne alkaliske absorptionsvæsker også optager kuldioxiden i ventilationsluften og den, der er dannet ved respiration i aerobe forsøg, må de udskiftes regelmæssigt for at de ikke skal blive mættet og tabe absorptionsevnen.

▼B

1.8.2. **Type og antal akvatiske sedimenter**

Prøvetagningsstedet skal vælges i henhold til formålet med det pågældende forsøg. Ved valg af prøvetagningssted må der tages hensyn til oplysninger om eventuel tidligere tilførsel fra landbrug, industri eller husholdninger til vandene opstrøms for prøvearealet. Har sedimenterne inden for de foregående fire år været forurenet med prøvestoffet eller stoffer strukturelt beslægtet hermed, bør de ikke anvendes.

1.8.2.1. *Valg af sediment*

Til aerobe forsøg anvendes normalt to sedimenter (7). De to valgte sedimenter skal være forskellige med hensyn til organisk kulstofindhold og tekstur. Det ene sediment skal have højt organisk kulstofindhold (2,5-7,5 %) og fin tekstur, det andet skal have lavt organisk kulstofindhold (0,5-2,5 %) og grov tekstur. Forskellen i organisk kulstofindhold skal normalt være mindst 2 %. Ved »fin tekstur« forstås, at indholdet af [ler + silt] ([1]) > 50 %, og ved »grov tekstur« forstås, at indholdet af [ler + silt| < 50 %. Forskellen i indholdet af [ler + silt] i de to sedimenter bør normalt være mindst 20 %. I tilfælde, hvor et kemisk stof også kan blive ført til marine vande, skal mindst det ene vandsedimentsystem være af marin oprindelse.

Til det rent anaerobe forsøg tages to sedimentprøver (sammen med de tilhørende vande) fra det anaerobe område af overfladevandområderne (7). Der drages omsorg for, at ilten ikke får adgang til sediment- eller vandfasen under håndtering og transport.

Også andre parametre kan være vigtige ved valg af sedimenter og må tages i betragtning i de enkelte tilfælde. For eksempel vil sedimenternes pH-område være vigtig ved testning af stoffer, hvis omdannelse og/eller sorption kan være pH-afhængig. pH-afhængig sorption kan afspejle sig i prøvestoffets $pK_a$-værdi.

1.8.2.2. *Karakterisering af vand-sediment prøver*

I nedenstående tabel er angivet de nøgleparametre, der skat måles og rapporteres (med henvisning til den anvendte metode) for både vand og sediment, samt på hvilket trin i forsøget disse parametre skal bestemmes. Til orientering er metoder til bestemmelse af de pågældende parametre givet i henvisning (18)(19)(20)(21).

Derudover kan der i det enkelte tilfælde være behov for måling og af andre parametre (f.eks, for ferskvand; partikler, alkalinitet, hårdhed, ledningsevne, $NO_3/PO_4$ (forhold og enkeltværdier); for sedimenter: kationbytrerkapacitet, vandholdende evne, karbonat, total kvælstof og fosfor; og for marine systemer: salinitet). Analyse af sedimenter og vand for nitrat, sulfat, biotilgængeligt jern og eventuelle andre elektronacceptorer kan desuden være nyttig til vurdering af redoxforholdene, specielt i forbindelse med anaerob omdannelse.

([1]) [Ler + silt] er den mineralfraktion af sedimentet, hvis partikelstørrelse er < 50 µm.

▼B

**Måling af parametre til karakterisering af vand-sediment prøver(7)(22)(23)**

| Parameter | Forsøgsfase | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | mark prøve-tagning | efter håndteri ng | start på akklimatise ring | start på forsøg | under forsøg | forsøgets slutning |
| **Vand** | | | | | | |
| Oprindelse/kilde | X | | | | | |
| Temperatur | X | | | | | |
| pH | X | | X | X | X | X |
| totalt organisk kulstof (TOC) | | | X | X | | X |
| $O_2$-koncentration* | X | | X | X | X | X |
| Redoxpotentiale* | | | X | X | X | X |
| **Sediment** | | | | | | |
| Oprindelse/kilde | X | | | | | |
| Lagdybde | X | | | | | |
| pH | | X | X | X | X | X |
| Partikelstørrelsesfordeling | | X | | | | |
| totalt organisk kulstof (TOC) | | X | X | X | | X |
| Mikrobiel biomasse (*) | | X | | X | | X |
| Redoxpotentiale (**) | Observa-tion (farve/ lugt) | | X | X | X | X |

(*) Nyere forskning har vist, at målinger af vandets iltindhold og redoxpotentiale hverken har mekanistisk eller prædiktiv værdi med hensyn til mikrobielle populationers vækst og udvikling i overfladevande (24)(25). Bestemmelse af biokemisk iltforbrug (BOD, ved prøvetagning i marken, ved forsøgets start og slutning) og koncentrationen af mikro- og makronæringsstofferne Ca, Mg og Mn (ved forsøgets start og slutning) i vand samt måling af totalt kvælstof og totalt fosfor i sedimenter (ved prøvetagning i marken, ved forsøgets start og slutning) kan være mere velegnede som værktøjer til forståelse og vurdering aerobe biomdannelseshastigheder og -veje.

(**) Metoder baseret på mikrobiel respirationshastighed (26), rygning (27) eller kolonitælling (f.eks. bakterier, aktinomyceter, svampe og totalkolonier) til aerobe forsøg; methandannelseshastigheden ved anaerobe forsøg.

1.8.3. **Indsamling, håndtering og opbevaring**

1.8.3.1. *Indsamling*

Udtagning af prøver af sediment skal ske i overensstemmelse med udkastet til ISO-vejledningen for prøvetagning af bundsediment (8). Sedimentprøver skal tages fra hele den øverste 5 til 10 cm dybe del af sedimentlaget. Det tilhørende vand skal indsamles fra samme areal eller lokalitet og på samme tidspunkt som sedimentet. Til det anaerobe forsøg skal prøven af sedimentet og det tilhørende vand udtages og transporteres uden adgang af ilt (28) (jf. 1.8.2.1). I litteraturen beskrives nogle prøvetagningsanordninger(8)(23).

▼B

1.8.3.2. *Håndtering*

Sedimentet adskilles fra vandet ved filtrering og vådsigtes gennem en 2 mm sigte med overskud af vand fra indsamlingsstedet, og det overskydende vand herfra kasseres. Derefter blandes kendte mængder sedimenter og vand i det ønskede forhold (jf, 1.9.1) i inkubationsflasker og forberedes til akklimatiseringsperioden (jf. 1.8.4). Til det anaerobe forsøg skal al håndtering ske under udelukkelse af ilt (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3. *Opbevaring*

Brug af frisk udtagede prøver af sediment og vand må stærkt anbefales, men er opbevaring nødvendig, skal sediment og vand sigtes som beskrevet ovenfor og opbevares sammen under vand (et 6-10 cm vandlag), i mørke ved 4 ± 2 °C ([1]) i højst 4 uger (7)(8)(23). Prøver, som skal anvendes til aerobe forsøg, skal opbevares med fri luftadgang (f.eks i åbne beholdere), hvorimod prøver til anaerobe forsøg opbevares under udelukkelse af ilt. Under transport og opbevaring må ikke forekomme frysning af sediment og vand eller udtørring af sedimentet.

1.8.4. **Klargøring af prøverne af sediment/vand til forsøget**

Før prøvestoffet tilsættes, skal der hengå en akkltmatiseringsperiode, hvor hver sediment/vandprøve er anbragt i den inkubationsbeholder, som skal bruges i hovedforsøget, og akklimatiseringen skal finde sted under nøjagtig samme betingelser som ved inkubationen under forsøget (se 1.9.1). Akklimatiseringsperioden skal svare til den tid, systemet er om at nå en rimelig stabilitet, således som det ses af pH, oxygenkoncentrationen i vandet, redoxpotentiale af sediment og vand, og den makroskopiske adskillelse af faserne, Akklimatiseringen skal normalt vare mellem en og to uger og bør ikke overstige fire uger. Resultaterne af de bestemmelser, der er foretaget i denne periode, skal angives i rapporten.

1.9. UDFØRELSE AF FORSØGET

1.9.1. **Forsøgsbetingelser**

Forsøget udføres i inkubationsapparat (se 1.8.1) med et vand:sediment volumenforhold mellem 3:1 og 4:1 og et sedimentslag 2,5 cm (± 0,5 cm). Det anbefales at bruge mindst 50 g sediment (på tørvogtsbasis) per inkubationsbeholder.

Forsøget udføres i mørke ved konstant temperatur mellem 10 og 30 °C, En temperatur på (20 ± 2) °C er passende. Når det er hensigtsmæssigt, kan man i de enkelte tilfælde overveje en yderligere lav temperatur (f.eks. 10 °C), alt efter hvilke oplysninger forsøget skal give. Inkubationstemperaturen skal overvåges og rapporteres.

([1]) Nyere undersøgelser har vist. at der ved opbevaring ved 4 °C kan indtræde et fald i sedimentets organiske kulstofindhold, muligvis med nedsat mikrobiel aktivitet til følge (34).

▼B

1.9.2. **Behandling og tilsætning af prøvestoffet**

Der anvendes én prøvekoncentration af det kemiske stof ([1]). For plantebeskyttelsesmidler, som tilføres vandområderne direkte, anvendes som maksimal spredemængde den på mærkaten angivne maksimumsdosering, beregnet på grundlag af overfladearealet af vandet i prøvekarret. I alle andre tilfælde beregnes den anvendte koncentration på grundlag af prognoser baseret på de udledte mængder. Der skal drages omsorg for at sikre, at den tilførte mængde prøvestof er tilstrækkelig til at give mulighed for at karakterisere dets omdannelsesvej og omdannelsesprodukternes dannelse og nedbrydning. Det kan være nødvendigt at tilsætte højere doser (f.eks. 10 gange) i tilfælde, hvor stoffets koncentrationer ved forsøgets begyndelse er nær detektionsgrænsen og/eller hvis de vigtigste omdannelsesprodukter ikke let kan detekteres, når de optræder i en mængde på 10 % af den af prøvestoffet tilførte mængde. Anvendes højere testkoncentrationer, må disse dog ikke have nævneværdig ugunstig virkning på den mikrobielle aktivitet af vand-sediment systemet. For at opnå konstant prøvestofkoncentration i prøvekar af forskellige dimensioner vil det eventuelt blive fundet hensigtsmæssigt at korrigere den tilførte stofmængde på grundlag af dybden af vandsøjlen i karret i forhold til vanddybden i marken (som sættes til 100 cm, men andre dybder kan anvendes). Et eksempel på beregningsmåden er givet i bilag 4.

Ideelt skal prøvestoffet tilsættes prøvesystemets vandfase som vandig opløsning. Når det er uomgængelig nødvendigt, kan der bruges små mængder vandblandbare opløsningsmidler (som f.eks, acetone eller ethanol) til at tilføre og fordele prøvestoffet, men den tilsatte mængde må ikke udgøre over 1 % v/v eller have ugunstig virkning på den mikrobielle aktivitet af prøvesystemet. Den vandige opløsning af prøvestoffet skal fremstilles med omhu — det kan være hensigtsmæssigt at anvende en generatorsøjle og forblanding for at sikre fuldstændig homogenitet. Efter tilsætning af den vandige opløsning til prøvesystemet anbefales, at vandfasen blandes forsigtigt, så sedimentet forstyrres mindst muligt.

Det kan normalt ikke anbefales at anvende det færdigformulerede produkt, da indholdsstofferne i formuleringen kan påvirke prøvestoffets og/eller omdannelsesprodukternes fordeling mellem vand- og sedimentfase. For prøvestoffer med ringe opløselighed i vand kan anvendelse af det formulerede stof dog være et hensigtsmæssigt alternativ.

Antallet af inkubationsbeholdere afhænger af antal prøvetagningstidspunkter (se 1.9.3). Der skal indgå tilstrækkeligt mange prøvesystemer til, at der kan ofres to systemer for hvert prøvetagningstidspunkt. Anvendes der kontrolenheder med hvert akvatisk sedimentsystem, skal disse ikke behandles med prøvestof. Kontrolenhederne kan benyttes til at bestemme sedimentets mikrobielle biomasse og det totale organiske kulstofindhold i vand og sediment ved forsøgets slutning. To af kontrolenhederne (dvs. én kontrolenhed af hvert akvatisk sediment) kan anvendes til at overvåge de ønskede parametre i sediment og vand i akklimatiseringsperioden (se tabellen i 1.8.2.2). Når prøvestoffet tilføres ved hjælp af et opløsningsmiddel, skal der indgå to ekstra kontrolenheder til bestemmelse af ugunstig påvirkning af den mikrobielle aktivitet i prøvesystemet,

([1]) Prøvning med endnu en koncentration kan være nyttig for stoffer, som tilføres overfladevandene ad forskellige veje med deraf følgende forskelle i koncentration, når blot den laveste koncentration kan analyseres med tilstrækkelig nøjagtighed.

▼B

1.9.3. **Forsøgsvarighed og prøvetagning**

Forsøget bør normalt ikke strække sig over mere 100 dage (6) og skal løbe, indtil nedbrydningsvej og vand/sediment fordelingsmønster er klarlagt, eller indtil 90 % af prøvestoffet er spredt ved omdannelse og/eller fordampning. Antal prøvetagningstidspunkter skal være mindst seks (inklusive tidspunktet nul), idet en hensigtsmæssig prøvetagningsplan og forsøgets varighed fastlægges i en frivillig indledende undersøgelse (se 1.9.4), medmindre der fra tidligere undersøgelser foreligger tilstrækkelige data om prøvestoffet. For hydrofobe prøvestoffer kan ekstra prøvetagningspunkter være nødvendige i den indledende del af forsøgsperioden for at bestemme fordelingsforholdet mellem vand- og sedimentfase.

På passende prøvetagningstidspunkter udtages komplette (ens) inkubationsbeholdere til analyse. Sedimentet og det overliggende vand analyseres hver for sig ([1]). Overfladevandet fjernes forsigtigt med mindst mulig forstyrrelse af sedimentet. Til ekstraktion og karakterisering af prøvestof og omdannelsesprodukter skal anvendes egnede analysemetoder. Der drages omsorg for at fjerne materiale, som kan være adsorberet til inkubationsbeholderen eller til de forbindelsesslanger, der anvendes til opsamling af flygtige stoffer.

1.9.4. **Frivillig forundersøgelse**

Kan forsøgsvarighed og prøvetagningsfrekvens ikke skønsmæssigt fastlægges ud fra andre relevante undersøgelser af prøvestoffet, vil en frivillig forundersøgelse eventuelt blive fundet hensigtsmæssig og skal i så fald udføres under de forsøgsbetingelser, som påtænkes for den endelige undersøgelse. Hvis en sådan forundersøgelse gennemføres, skal relevante forsøgsomstændigheder og resultater for denne kortfattet rapporteres.

1.9.5. **Målinger og analyse**

For hvert prøvetagningstidspunkt måles og rapporteres koncentrationen af prøvestof og omdannelsesprodukter i vand og sediment (som koncentration og som procent af tilført mængde). Normalt skal omdannelsesprodukter, som på noget prøvetagningstidspunkt er detekteret som ≥10 % af den mængde radioaktivitet, der er tilført det samlede vand-sediment-system, identificeres, medmindre undladelse heraf med rimelighed kan begrundes. Også for omdannelsesprodukter med konstant stigende koncentration hen gennem forsøget må identifikation overvejes selv om deres koncentrationen ikke er over de nævnte grænser, da dette tyder på, at de er persistente. Der må ske en konkret vurdering heraf i det enkelte tilfælde, og begrundelser gives i rapporten.

Resultater fra opsamlingen af gasser/flygtige stoffer ($CO_2$ og andet, dvs. flygtige organiske forbindelser), rapporteres for hvert prøvetagningstidspunkt. Mineraliseringshastigheder skal ligeledes rapporteres. Ikke-ekstraherbare (bundne) rester i sediment rapporteres for hvert prøvetagningspunkt.

([1]) Hvis anaerobe omdannelsesprodukter let kan blive reoxideret, skal der opretholdes anaerobe betingelser under prøvetagning og analyse.

▼B

2. **DATA**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

For hvert prøvetagningstidspunkt beregnes en total massebalance eller genfindingsgrad (se 1.7.1) for den tilsatte radioaktivitet. Resultaterne angives i procent af tilsat mængde radioaktivitet. For hvert prøvetagningstidspunkt skal fordelingen af radioaktivitet mellem vand og sediment angives som koncentration og som procentdel.

Halveringstiden, $DT_{50}$ og, i givet fald, $DT_{75}$ og $DT_{90}$ for prøvestoffet beregnes med tilhørende konfidensgrænser (jf. 1.7.3). Oplysninger om prøvestoffets spredning i vand og sediment kan opnås ved hjælp af passende evalueringsværktøjer. Disse kan række fra anvendelse af pseudo første ordens kinetik og empirisk kurvetilpasning med grafisk eller numerisk løsning til mere komplekse analyser, f.eks. baseret på en- eller flerkompartmentmodeller. Nærmere detaljer kan hentes i litteraturen (35)(36)(37).

Alle metoderne har stærke og svage sider og er meget forskellige i kompleksitet, Antagelse af første ordens kinetik kan være en oversimplificering af nedbrydnings- og fordelingsprocesserne, men når den er er mulig, resulterer den i et letforståeligt begreb (hastighedskonstanten eller halveringstiden), som er værdifuldt i simuleringsmodeller og beregninger af forventede koncentrationer i miljøet. Empiriske metoder eller lineær transformation kan give bedre tilpasning af kurver til data og dermed mulighed for bedre skøn over halveringstider, $DT_{50}$- og, i givet fald. $DT_{75}$- og $DT_{90}$-værdier. De afledte konstanter har imidlertid begrænset anvendelse. Af kompartmentmodeller kan uddrages en række nyttige konstanter, som har værdi ved risikovurderinger og beskriver nedbrydningshastigheden i forskellige kompartments og det kemiske stofs fordeling. Desuden bør de anvendes ved bestemmelse af hastighedskonstanter for dannelse og nedbrydning af hovedomdannelsesprodukterne. I alle tilfælde skal valget af den anvendte metode begrundes, og eksperimentatoren skal grafisk og/eller statistisk påvise tilpasningsgraden.

3. **RAPPORTERING**

3.1. FORSØGSRAPPORT

Rapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Prøvestof;

— generisk navn, kemisk navn. CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af det mærkede atom, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) af prøvestoffet

— i givet fald, det mærkede kemiske stofs radiokemiske renhed og molære aktivitet.

▼B

Referencestoffer:

— kemisk navn og struktur for de referencestoffer, som er anvendt til karakterisering og/eller identifikation af omdannelsesprodukter

Testsedimenter og -vande:

— beliggenhed og beskrivelse af det eller de steder, hvor der er udtaget prøver af akvatisk sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening

— udtømmende oplysninger om indsamling, eventuel opbevaring og akklimatisering af vand-sediment systemer

— vand-sediment prøvernes karakteristika som angivet i tabellen i 1.8.2.2.

Forsøgsbetingelser:

— det anvendte forsøgssystem (f.eks. gennemstrømning, biometer, ventilationsmåde, omrøringsmåde, vandvolumen, sedimentmasse, tykkelsen af både sediment- og vandlag, prøvekarrenes dimension osv.)

— tilførsel af prøvestoffet til systemet: anvendt testkoncentration, antal gentagelser og kontrolprøver, måden, hvorpå prøvestoffet tilføres (f.eks. brug af eventuelt opløsningsmiddel) osv.

— inkubationstemperatur

— prøvetagningstidspunkter

— ekstraktionsmetoder og -udbytte samt analysemetoder og detektionsgrænser

— metoder til karakterisering/identifikation af omdannelsesprodukter

— afvigelser fra forsøgsprotokollen eller forsøgsbetingelserne under forsøget.

Resultater:

— rådata (talværdier) for repræsentative analyser (samtlige rådata skal opbevares i GLP-arkivet)

— repeterbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder

— genfindingsgrad ( %-værdier for en gyldig undersøgelse er angivet i 1.7.1)

— tabeller med resultater, angivet i % af den tilførte begyndelsesdosis og i rng.$kg^{-1}$ i vand, sediment og det samlede system (kun som %) for prøvestoffet og, i givet fald, for omdannelsesprodukter og ikke- ekstraherbar radioaktivitet

— massebalance før, under og efter forsøgene

— grafisk fremstilling af omdannelsen i vand- og sedimentfraktionen og det samlede system (inklusive mineralisering)

— mineraliseringshastigheder

▼B

— halveringstid, $DT_{50}$ og, i givet fald, $DT_{75}$ and $DT_{90}$ for prøvestoffet og for eventuelle hovedomdannelsesprodukter i vand, sediment og det samlede system

— en vurdering af omdannelseskinetikken af prøvestoffet og, i givet fald, hovedomdannelsesprodukterne

— formodet omdannelsesvej. når det er relevant

— diskussion af resultater.

4. **HENVISNINGER**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (19S2). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 3O4A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R, Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114, J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987), The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with $^{14}C$-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater ($17^{th}$ edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop »A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests«, 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 3 1, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, C, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber. J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn. D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986), A batch test for assessing the mineralisation of $^{14}C$- radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants, Bulletin Environ. Contam, Toxicol, 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II, Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

*Bilag 1*

## VEJLEDNING I AEROBE OG ANAEROBE TESTSYSTEMER

### Aerobt testsystem

Det her beskrevne aerobe testsystem består af et aerobt vandlag (typisk iltkoncentration fra 7 til 10 $mg.l^{-1}$) og et sedimentlag, som er aerobt ved overfladen og anaerobt under overfladen (typisk gennemsnitligt redoxpotentiale ($E_h$) i sedimentlagets anaerobe zone: - 80 til - 190 mV). Der ledes befugtet luft hen over vandoverfladen i hver inkubationsenhed for at opretholde tilstrækkelig iltkoncentration i head space.

### Anaerobt testsystem

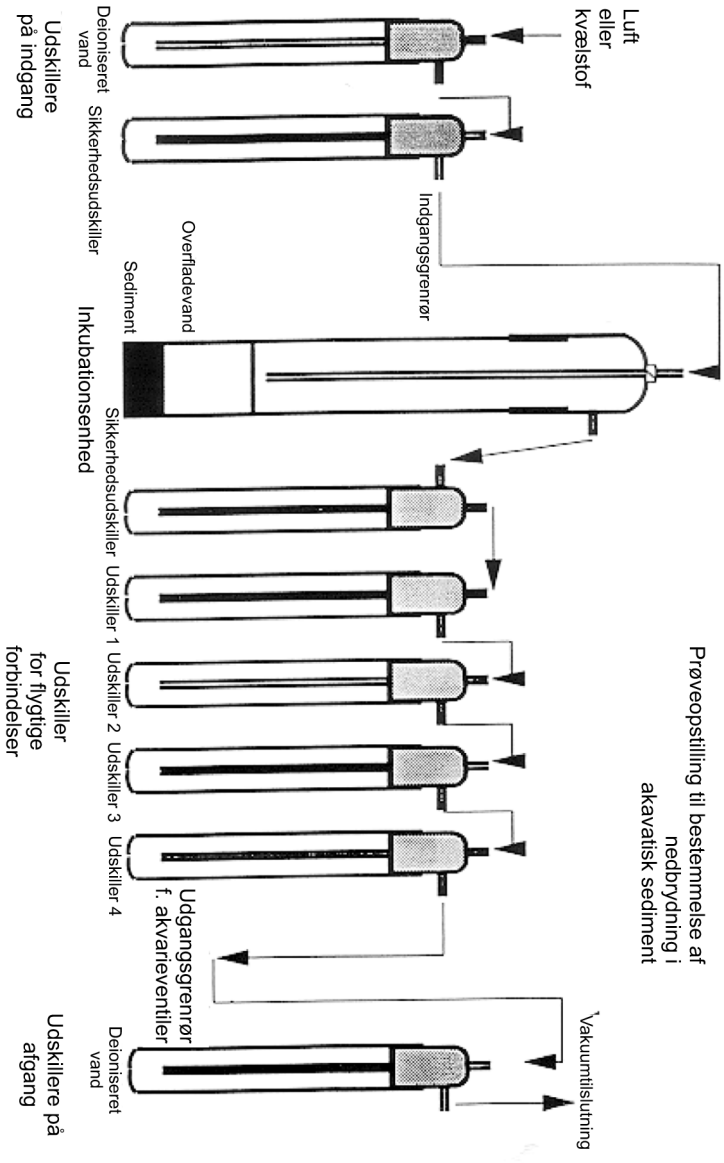
Forsøgsmetoden med det anaerobe testsystem er i hovedsagen den samme som for det aerobe system, bortset fra at der ledes befugtet kvælstof over vandoverfladen for at opretholde et nitrogenfyldt headspace. Sediment og vand anses for anaerobt, når redoxpotentialet ($E_h$) er under - 100 mV.

I det anaerobe forsøg omfatter bestemmelsen af mineraliseringen måling af den udviklede kuldioxid og methan.

▼B

*Bilag 2*

**EKSEMPEL PÅ GENNEMSTRØMNINGSAPPARAT**

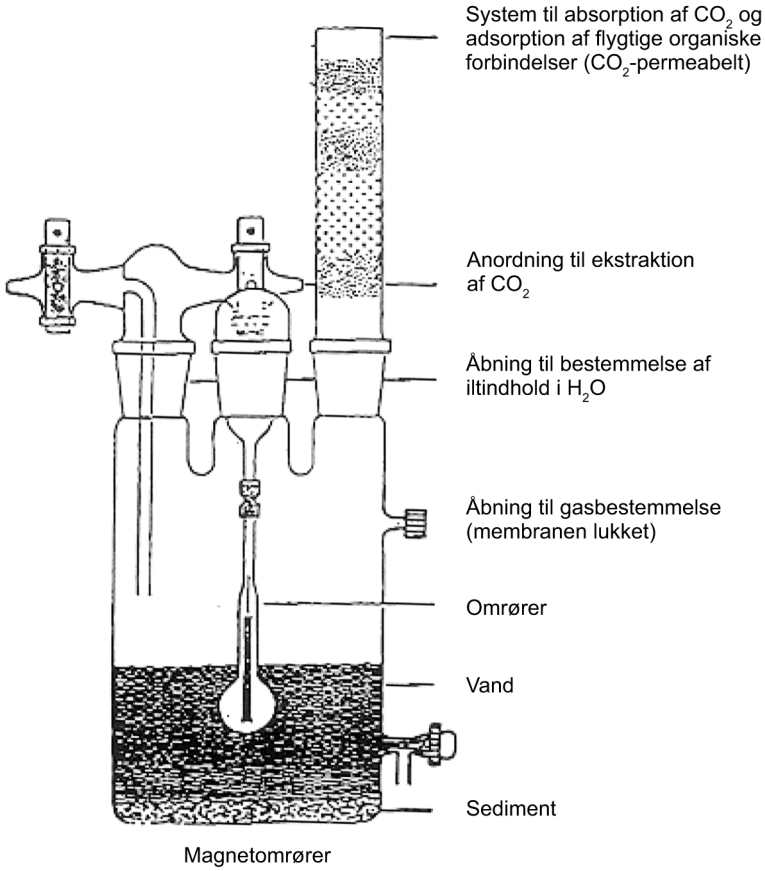



Sikkerhedsudskiller, tom
Udskiller 1:
ethylenglycol til udskillelse af flygtige organiske forbindelser
Udskiller 2:
svovlsyre, 0,1 M, til udskillelse af flygtige alkaliske forbindelser
Udskiller 3 og 4:
natriumhydroxid, 2 M, til udskillelse af $CO_2$ og andre flygtige sure forbindelser

▼B

*Bilag 3*

**EKSEMPEL PÅ APPARAT AF BIOMETERTYPEN**



▼B

*Bilag 4*

**EKSEMPEL PÅ BEREGNING AF MÆNGDE TILSAT PRØVEBEHOLDERNE**

| | |
|---|---|
| Flankens indvendige diameter: | = 8 cm |
| Dybde af vandsøjle, eksklusive sediment: | = 12 cm |
| Overfladeareal: $3{,}142 \times 4^2$ | = 50,3 $cm^2$ |
| Spredemængde: 500 g prøvestof/ha svarer til 5 µg/$cm^2$ | |
| Total µg: $5 \times 50{,}3$ | = 251,5 µg |
| Mængden korrigeres til en dybde på 100 cm: | |
| $12 \times 251{,}5 : 100$ | = 30,18 µg |
| Vandsøjlens rumfang: $50{,}3 \times 12$ | = 603 ml |
| Koncentrationen i vand: 30,18 : 603 | = 0,050 µg/ml eller 50 µg/l |

▼M1

## C.25. AEROB MINERALISERING I OVERFLADEVAND — SIMULERET BIONEDBRYDNINGSFORSØG

### 1. METODE

Metoden er ækvivalent med OECD TG 309 (2004) (1).

### 1.1. INDLEDNING

Formålet med forsøget er at bestemme det tidsmæssige forløb af bionedbrydningen af et prøvestof med lav koncentration i aerobt naturligt vand og at kvantificere iagttagelserne i form af kinetiske hastighedsudtryk. Dette simuleringsforsøg er et shake-flask batch-forsøg i laboratoriet og har til formål at bestemme hastigheden af aerob bionedbrydning af organiske stoffer i prøver af naturligt vand (ferskvand, brakvand eller søvand). Det bygger på ISO/DIS 14592-1 (2) og indeholder desuden elementer fra prøvemetode C.23 og C.24 (3)(4). Langvarige forsøg kan valgfrit udføres som semikontinuerte forsøg i stedet for batchforsøg for at undgå ældning af mikromiljøet i forsøget. Hovedformålet med simuleringsforsøget er at bestemme mineraliseringen af prøvestoffet i overfladevand, og mineraliseringen danner grundlaget for de udtryk, der formulerer nedbrydningskinetikken. Et sekundært, valgfrit formål med forsøget er imidlertid at skaffe oplysninger om den primære nedbrydning og dannelsen af de vigtigste omdannelsesprodukter. Identifikation af omdannelsesprodukter og, om muligt, kvantitativ bestemmelse af disse er særligt vigtig for stoffer, der mineraliseres meget langsomt (f.eks. med en halveringstid for total residual $^{14}C$ på over 60 dage). Pga. begrænsningerne i analyseteknikken bør der normalt anvendes højere prøvestofkoncentration (f.eks. > 100 µg/l) til identifikation og kvantificering af vigtige omdannelsesprodukter.

I dette forsøg forstås ved »lav koncentration« en koncentration, der er så lav (f.eks. mindre end 1 µg/l til 100 µg/l), at den i forsøget iagttagne bionedbrydningskinetik med sikkerhed afspejler den, der forventes at gælde i miljøet. I forhold til den samlede masse bionedbrydeligt kulstofsubstrat, der er til rådighed i det i forsøget anvendte naturlige vand, vil prøvestoffet, der er til stede i lav koncentration, kun være et sekundært substrat. Dette forudsætter, at den forventede bionedbrydningskinetik er af første orden (»non-growth« kinetik), og at prøvestoffet kan nedbrydes ved »co-metabolisme«. Ved første ordens kinetik er nedbrydningshastigheden (mg/l/dag) proportional med substratkoncentrationen, der aftager med tiden. Ved ægte første ordens kinetik er den specifikke nedbrydningshastighedskonstant, k, uafhængig af tiden og af koncentrationen. Det vil sige, at k ikke ændrer sig nævneværdigt i samme forsøg og ikke ændrer sig med den tilsatte koncentration mellem forskellige forsøg. Ved den specifikke nedbrydningshastighedskonstant forstås den relative koncentrationsændring pr. tidsenhed: k. Ved første ordens kinetik er nedbrydningshastigheden (mg/l/dag) proportional med substratkoncentrationen, der aftager med tiden. Ved ægte første ordens kinetik er den specifikke nedbrydningshastighedskonstant, k, uafhængig af tiden og af koncentrationen. Det vil sige, at k ikke ændrer sig nævneværdigt i samme forsøg og ikke ændrer sig med den tilsatte koncentration mellem forskellige forsøg. Ved den specifikke nedbrydningshastighedskonstant forstås den relative koncentrationsændring pr. tidsenhed: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Skønt der under de foreskrevne betingelser normalt forventes første ordens kinetik, kan der være omstændigheder, hvor andre kinetiske love giver bedre overensstemmelse. Afvigelser fra første ordens kinetik ses f.eks., hvis det er massetransportfænomener, f.eks. diffusionshastigheden, snarere end den biologiske reaktionshastighed, der er hastighedsbegrænsende for den biologiske omdannelse. Data kan imidlertid næsten altid beskrives ved pseudo første ordens kinetik, når det accepteres, at hastighedskonstanten er koncentrationsafhængig.

▼M1

Inden forsøget bør der foreligge oplysninger om biologisk nedbrydning af prøvestoffet ved højere koncentrationer (f.eks. fra rutinemæssige screeningstest) og oplysninger om abiotisk nedbrydning, omdannelsesprodukter og relevante fysisk-kemiske egenskaber, hvilket vil lette planlægning af forsøget og fortolkning af resultaterne. Ved at anvende $^{14}C$-mærket prøvestof og bestemme fasefordelingen af $^{14}C$ ved forsøgets afslutning kan den endelige bionedbrydelighed bestemmes. Er prøvestoffet umærket, kan den endelige bionedbrydning kun bestemmes, hvis der testes en højere koncentration, og alle vigtige omdannelsesprodukter kendes.

1.2. DEFINITIONER

**Primær bionedbrydning**: Den strukturændring (omdannelse) af et kemisk stof, der frembringes af mikroorganismer og medfører, at stoffet mister sin kemiske identitet.

**Funktionel bionedbrydning**: Den strukturændring (omdannelse) af et kemisk stof, som frembringes af mikroorganismer og medfører tab af en bestemt egenskab.

**Endelig aerob bionedbrydning**: Den af mikroorganismer i tilstedeværelse af oxygen frembragte nedbrydning af et kemisk stof til carbondioxid, vand og uorganiske salte af eventuelle andre grundstoffer, der er til stede (mineralisering) og produktion af ny biomasse og organiske mikrobielle biosynteseprodukter.

**Mineralisering**: Den af mikroorganismer i tilstedeværelse af oxygen frembragte nedbrydning af et kemisk stof eller organisk materiale til carbondioxid, vand og uorganiske salte af eventuelle andre grundstoffer, der er til stede.

**Lag-fase**: Den tid, der går fra et forsøg begynder, indtil de nedbrydende mikroorganismer har tilpasset sig, og nedbrydningsgraden for et kemisk stof eller organisk materiale har nået et detekterbart omfang (f.eks. 10 % af den teoretiske maksimale bionedbrydning, evt. mindre, afhængigt af måleteknikkens nøjagtighed).

**Maksimal bionedbrydningsgrad**: Den grad af bionedbrydning af et kemisk stof eller organisk materiale, angivet i procent, der finder sted i et forsøg, og over hvilken der ikke sker yderligere bionedbrydning under forsøget.

**Primært substrat**: En række naturlige kulstof- og energikilder, der tjener til vækst og opretholdelse af den mikrobielle biomasse.

**Sekundært substrat**: En substratkomponent, der er til stede i så lav koncentration, at dens nedbrydning kun tilfører ubetydelige mængder kulstof og energi til de kompetente mikroorganismer i forhold til den mængde kulstof og energi, der tilføres ved nedbrydning af hovedsubstratets komponenter (de primære substrater).

**Nedbrydningshastighedskonstant**: En første ordens eller pseudo første ordens hastighedskonstant k ($d^{-1}$), der angiver nedbrydningsprocessers hastighed. For et batch-forsøg beregnes k af den første del af nedbrydningskurven efter slutningen af lag-fasen.

▼M1

**Halveringstid, $t_{1/2}$ (d)**: En betegnelse til karakterisering af hastigheden af en første ordens reaktion. Halveringstiden er tidsrummet svarende til en formindskelse af koncentrationen med en faktor 2. Sammenhængen mellem halveringstiden og hastighedskonstanten er givet ved udtrykket $t_{1/2} = \ln 2/k$.

**Nedbrydningshalveringstid, $DT_{50}$ (d)**: En betegnelse, der anvendes til kvantitativ angivelse af resultatet af bionedbrydningsforsøg. Det er det tidsrum, inklusive lag-fasen, der er nødvendigt for at nå 50 % bionedbrydning.

**Detektionsgrænse (limit of detection (LOD)) og kvantificeringsgrænse (limit of quantification (LOQ))**: Detektionsgrænsen er den koncentration af et stof, under hvilken stoffets identitet ikke kan skelnes fra analysebetingede artefakter. Kvantificeringsgrænsen er den koncentration af et stof, under hvilken koncentrationen ikke kan bestemmes med acceptabel nøjagtighed.

**Opløst organisk kulstof (dissolved organic carbon (DOC))**: Den del af det organiske kulstofindhold i en prøve af vand, som ikke kan fjernes ved den foreskrevne faseadskillelse som f.eks. ved centrifugering ved 40 000 $ms^{-2}$ i 15 min. eller ved membranfiltrering med porestørrelse 0,2 μm-0,45 μm i diameter.

**Total organisk $^{14}C$-aktivitet (total organic $^{14}C$ activity (TOA))**: Den totale $^{14}C$-aktivitet, der er knyttet til organisk kulstof.

**Opløst organisk $^{14}C$-aktivitet (dissolved organic $^{14}C$ activity (DOA))**: Den totale $^{14}C$-aktivitet, der er knyttet til opløst organisk kulstof.

**Partikelbåren organisk $^{14}C$-aktivitet (particulate organic $^{14}C$ activity (POA))**: Den totale $^{14}C$-aktivitet, der er knyttet til partikelformigt organisk kulstof.

1.3. PRØVEMETODENS ANVENDELIGHED

Denne simuleringsmetode er anvendelig til ikke-flygtige eller svagt flygtige organiske stoffer, der testes ved lave koncentrationer. Når der bruges kolber med åben forbindelse til atmosfæren (f.eks. med vatprop), kan stoffer med Henrys lov konstant mindre end omkring 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (ca. $10^{-5}$ $atm \cdot m^3/mol$) i praksis regnes for ikke-flygtige. Ved at anvende lukkede kolber med headspace kan man teste svagt flygtige stoffer (med Henrys lov konstant < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < $10^{-3}$ $atm \cdot m^3/mol$) uden tab fra prøvesystemet. Tab af $^{14}C$-mærkede stoffer kan forekomme, hvis der ikke er truffet passende forholdsregler, når $CO_2$ fjernes. I sådanne tilfælde kan det være nødvendigt at opfange $CO_2$ i en intern absorber med alkali eller i et eksternt $CO_2$-absorbersystem (direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse, jf. tillæg 3). Til fastlæggelse af bionedbrydningens kinetik skal prøvestofkoncentrationen være lavere end stoffets opløselighed i vand. Det skal dog bemærkes, at man i litteraturen kan finde væsentligt højere værdier for vandopløseligheden end prøvestoffets opløselighed i naturlige vande. Om ønsket kan opløseligheden af prøvestoffer med ringe vandopløselighed bestemmes ved brug af de naturlige vande, som forsøget omfatter.

Metoden kan dels anvendes til simulering af bionedbrydning i overfladevand fri for grove partikler (»pelagisk forsøg«), dels i uklart vand som f.eks. nær grænsefladen mellem vand og sediment (»forsøg med opslæmmet sediment«).

▼M1

1.4. FORSØGETS PRINCIP

Forsøget udføres som batchforsøg med inkubering af prøvestoffet enten med overfladevand alene (»pelagisk forsøg«) eller overfladevand modificeret med en opslæmmet mængde faststof/sediment på 0,01 til 1 g tør vægt pr. liter (»forsøg med opslæmmet sediment«) til simulering af en vandmasse med opslæmmede faststoffer eller genopslæmmet sediment. I de fleste overfladevande vil koncentrationen af opslæmmet faststof/sediment typisk ligge i den nedre ende af dette interval. Prøvekolberne inkuberes i mørke ved rumtemperatur under aerobe forhold og med omrystning. Prøvestoffet skal anvendes i mindst to forskellige koncentrationer til fastlæggelse af nedbrydningskinetikken. De anvendte koncentrationer skal indbyrdes afvige med en faktor 5 til 10 og skal være repræsentative for det forventede koncentrationsområde i miljøet. Den maksimale prøvestofkoncentration må ikke være over 100 μg/l, dog må en maksimal prøvekoncentration på 10 μg/l eller derunder foretrækkes for at sikre, at bionedbrydningen følger første ordens kinetik. Den laveste koncentration må ikke være over 10 μg/l, men en laveste prøvekoncentration på 1-2 μg/l eller under 1 μg/l må foretrækkes. En så lav koncentration kan normalt analyseres tilfredsstillende ved hjælp af gængse $^{14}$C-mærkede stoffer. Analyseteknikkens begrænsninger gør det ofte umuligt at måle prøvestoffets koncentration med den krævede nøjagtighed, hvis prøvestoffet tilsættes i en koncentration ≤ 100 μg/l (jf. andet afsnit i punkt 1.7.2). Til identifikation og kvantitativ bestemmelse af de vigtigste omdannelsesprodukter kan anvendes højere prøvestofkoncentration (> 100 μg/l, undertiden > 1 mg/l), hvis man ikke råder over en specifik analysemetode med lav detektionsgrænse. Anvendes en høj prøvestofkoncentration, kan resultaterne muligvis ikke anvendes til at beregne første ordens nedbrydningskonstant og halveringstid, da nedbrydningen antagelig ikke vil følge første ordens kinetik.

Nedbrydningen følges med passende tidsintervaller ved måling enten af residual-$^{14}$C eller, hvis en specifik kemisk analyse anvendes, residualkoncentration af prøvestoffet. $^{14}$C-mærkning af den mest stabile del af molekylet giver mulighed for bestemmelse af den totale mineralisering, mens $^{14}$C-mærkning af en mindre stabil del af molekylet i lighed med en specifik analysemetode kun gør det muligt at bestemme den primære bionedbrydning. Den mest stabile del omfatter dog ikke nødvendigvis molekylets relevante funktionelle enhed (dvs. den enhed, der kan være knyttet til en specifik egenskab som toksicitet, bioakkumulering osv.). I så fald kan det være hensigtsmæssigt at $^{14}$C-mærke prøvestoffet i den funktionelle gruppe for at følge eliminationen af den specifikke egenskab.

1.5. OPLYSNINGER OM PRØVESTOFFET

Både radioaktivt mærket og umærket prøvestof kan anvendes i forsøget. $^{14}$C-mærkning anbefales, og mærkning bør normalt finde sted i molekylets mest stabile del(e) (jf. også punkt 1.4). I stoffer indeholdende mere end én aromatisk ring skal helst et eller flere kulstofatomer i hver ring være $^{14}$C-mærket. I bindinger, der let brydes, skal desuden et eller flere kulstofatomer på begge sider af bindingen helst være $^{14}$C-mærket. Prøvestoffets kemiske og/eller radiokemiske renhed skal være > 95 %. For radioaktivt mærkede stoffer skal den specifikke aktivitet helst være ca. 50 μCi/mg (1,85 MBq) eller derover for at lette $^{14}$C-målingerne i forsøg med lav initialkoncentration. Følgende oplysninger om prøvestoffet skal foreligge:

▼**M1**

— vandopløselighed [metode A.6]

— opløselighed i organiske(e) opløsningsmiddel (-midler) (stoffer, der tilføres med opløsningsmiddel eller er tungtopløselige i vand)

— for stoffer, som kan protoniseres eller deprotoniseres, dissociationskonstant (pKa) [OECD TG 112] (5)

— damptryk [metode A.4] og Henrys konstant

— kemisk stabilitet i vand og i mørke (hydrolyse) [metode C.7].

Når tungtopløselige stoffer testes i søvand, kan det desuden være nyttigt at kende udsaltningskonstanten (eller »Setschenows konstant«) $K^s$, der er defineret ved udtrykket: log (S/S') = $K^s$ $C_m$, where S and S' er stoffets opløselighed i henholdsvis ferskvand og søvand, og $C_m$ er den molære saltkoncentration.

Udføres forsøget som »forsøg med opslæmmet sediment«, skal der foreligge følgende oplysninger:

— fordelingskoefficient n-octanol/vand [metode A.8]

— adsorptionskoefficient [metode C.18].

Desuden kan følgende oplysninger være nyttige:

— stoffets koncentration i miljøet, hvis den kendes eller er beregnet

— prøvestoffets toksicitet over for mikroorganismer [metode C.11]

— umiddelbar og/eller naturlig bionedbrydelighed [metode C.4 A-F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)]

— aerob eller anaerob bionedbrydelighed i omdannelsesforsøg i jord og sediment/vand [metode C.23 og C.24].

1.6. REFERENCESTOF

Som referencestof anvendes et stof, der normalt er let nedbrydeligt under aerobe forhold (f.eks. anilin eller natriumbenzoat). Anilin og natriumbenzoat nedbrydes sædvanligvis på mindre end to uger. Formålet med referencestofferne er at sikre, at prøvevandets mikrobielle aktivitet er inden for visse grænser, dvs. at vandet indeholder en aktiv mikrobiel population.

▼M1

1.7. KVALITETSKRITERIER

1.7.1. **Genfinding**

Umiddelbart efter tilsætning af prøvestoffet skal hver begyndelseskoncentration verificeres ved måling af $^{14}C$-aktiviteten eller, for umærkede stoffer, ved kemisk analyse, idet der mindst anvendes dobbelte prøver. Dette vil give oplysninger om analysemetodens anvendelighed og repeterbarhed og om, hvor homogent prøvestoffet er fordelt. Ved den efterfølgende dataanalyse anvendes normalt den målte initiale $^{14}C$-aktivitet eller prøvestofkoncentration i stedet for den nominelle koncentration, så der tages højde for sorptionstab og doseringsfejl. For $^{14}C$-mærket prøvestof fås genfindingsgraden ved forsøgets slutning af en massebalance (jf. sidste afsnit i punkt 1.8.9.4). Ideelt skal massebalancen for radioaktivt mærket stof ligge mellem 90 % og 110 %, mens der for umærkede prøvestoffer bør opnås en analysenøjagtighed svarende til en genfinding af initialmængden på mellem 70 % og 110 %. De nævnte områder må opfattes som mål, ikke som acceptkriterier for forsøget. Hvis det ønskes, kan analysenøjagtigheden for prøvestoffet bestemmes ved en lavere koncentration end initialkoncentrationen samt for de vigtigste omdannelsesprodukter.

1.7.2. **Analysemetodens repeterbarhed og følsomhed**

Repeterbarheden af analysemetoden (herunder udvindingsgraden for den indledende ekstraktion) ved kvantitativ bestemmelse af prøvestof og, hvis relevant, omdannelsesprodukter kontrolleres ved fem replikate analyser på hver enkelt ekstrakt af overfladevand.

Analysemetodens detektionsgrænse for prøvestoffet og for omdannelsesprodukterne skal så vidt muligt udgøre mindst 1 % af den initiale mængde, der tilføres prøvesystemet. Kvantificeringsgrænsen skal være højst 10 % af den tilsatte koncentration. Til kemisk analyse af mange organiske stoffer og omdannelsesprodukter heraf må prøvestoffet ofte tilsættes i forholdsvis høj koncentration, dvs. > 100 µg/l.

1.8. BESKRIVELSE AF PRØVEMETODEN

1.8.1. **Udstyr**

Forsøget kan udføres i koniske eller cylindriske kolber af passende kapacitet (f.eks. 0,5 eller 1,0 liter), lukket med silicone- eller gummiprop, eller i serumflasker med $CO_2$-tæt låg (f.eks. med butylgummiseptum). En anden mulighed er at udføre forsøget med flere kolber og høste hele kolbens indhold, mindst som dobbeltprøver, ved hvert prøvetagningstidspunkt (jf. sidste afsnit i punkt 1.8.9.1). For ikkeflygtige prøvestoffer, der ikke er radioaktivt mærkede, kræves ikke gastætte propper eller låg. Velegnede er løse vatpropper, der forhindrer kontaminering fra luften (jf. andet afsnit i punkt 1.8.9.1). Svagt flygtige kemiske stoffer bør testes i et system af biometertypen med let omrøring af vandoverfladen. For at sikre mod bakteriel kontaminering kan beholderne valgfrit steriliseres ved opvarmning eller autoklavering inden brug. Desuden anvendes følgende standardlaboratorieudstyr:

— rystebord eller magnetomrørere til konstant omrøring af prøvekolberne

▼M1

— centrifuge

— pH-meter

— turbidimeter til nephelometrisk turbiditetsmåling

— ovn eller mikroovn til bestemmelse af tør vægt

— apparatur til membranfiltrering

— autoklave eller ovn til varmesterilisering af glasapparatur

— udstyr til håndtering af $^{14}C$-mærkede stoffer

— udstyr til kvantitativ bestemmelse af $^{14}C$-aktivitet i prøver fra $CO_2$-opsamlingsvæsker og, om nødvendigt, fra sedimentprøver

— analyseudstyr til bestemmelse af prøvestof (og referencestof), hvis der anvendes specifik kemisk analyse (f.eks. gaskromatograf eller højtryksvæskekromatograf).

1.8.2. **Stamopløsninger af prøvestoffet**

Til fremstilling af stamopløsningerne af prøve- og referencestof skal anvendes deioniseret vand (jf. første afsnit i punkt 1.8.7). Det deioniserede vand skal være frit for stoffer, der kan være toksiske for mikroorganismer, og indholdet af opløst organisk kulstof (dissolved organic carbon (DOC)) må ikke være over 1 mg/l (6).

1.8.3. **Indsamling og transport af overfladevand**

Prøvetagningsstedet, hvor overfladevandet indsamles, skal vælges i henhold til formålet med forsøget i den givne situation. Ved valg af prøvetagningssted må der tages hensyn til oplysninger om eventuel tidligere udledning fra landbrug, industri eller husholdninger. Hvis det akvatiske miljø vides at have været forurenet med prøvestoffet eller andre stoffer med analog struktur inden for de foregående fire år, bør det ikke anvendes til indsamling af vandprøver, medmindre undersøgeren udtrykkelig har ønsket at undersøge nedbrydningshastigheden på tidligere eksponerede steder. Vandets pH og temperatur skal måles på indsamlingsstedet. Desuden skal indsamlingsdybden og vandets udseende (f.eks. farve og turbiditet) noteres (jf. punkt 3). Oxygenkoncentrationen og/eller redoxpotentialet i vand og i sedimentets overfladelag skal måles for at påvise, at der er aerobe betingelser, medmindre dette er åbenbart, bedømt ud fra prøvens udseende og tidligere erfaringer med det pågældende sted. Overfladevandet skal transporteres i en omhyggeligt rengjort beholder. Under transporten må prøvens temperatur ikke være nævneværdigt højere end forsøgstemperaturen. Ved længere transporttid end 2-3 timer anbefales afkøling til 4 °C. Vandprøven må ikke fryses.

▼M1

1.8.4. **Opbevaring og klargøring af overfladevand**

Forsøget bør fortrinsvis igangsættes inden for ét døgn efter prøveindsamlingen. Er opbevaring af vandet nødvendig, bør dette begrænses til kortest mulig tid og må i intet tilfælde overstige fire uger. Vandprøven skal opbevares ved 4 °C med beluftning, indtil den skal bruges. Før brug skal grove partikler fjernes, f.eks. ved filtrering med nylonfilter med maskevidde ca. 100 μm, med et groft papirfilter eller ved bundfældning.

1.8.5. **Klargøring af vand modificeret med sediment (valgfrit)**

Anvendes opslæmmet sediment, tilsættes sedimentet til kolberne indeholdende naturligt vand (som er filtreret for at fjerne grove partikler som beskrevet i punkt 1.8.4), så der dannes en opslæmning med en faststofkoncentration mellem 0,01 og 1 g/l. Overfladesedimentet skal være fra samme indsamlingssted som vandprøven. Afhængigt af det pågældende akvatiske miljø kan overfladesedimentet enten karakteriseres som sediment med højt organisk kulstofindhold (2,5-7,5 %) og fin tekstur eller med lavt organisk kulstofindhold (0,5-2,5 %) og grov tekstur (3). Overfladesedimentet kan klargøres således: Ved hjælp af et transparent plastrør udtages adskillige sedimentkerner, de øverste aerobe lag skæres af (fra overfladen til en dybde af maks. 5 mm) straks efter prøvetagningen, hvorefter de hældes sammen. Den resulterende sedimentprøve transporteres i en beholder med stort luft-headspace for at opretholde aerobe betingelser (prøven afkøles til 4 °C, hvis transporttiden er over 2-3 timer). Sedimentprøven opslæmmes i prøvevandet i forholdet 1:10 og opbevares ved 4 °C med beluftning, indtil den skal bruges. Opbevaringstiden for sedimentet bør begrænses mest muligt og må i intet tilfælde overstige fire uger.

1.8.6. **Semikontinuert metode (valgfri)**

Det kan være nødvendigt med langvarig inkubering (flere måneder), hvis der optræder en lang lag-fase, før nævneværdig nedbrydning af prøvestoffet kan måles. Vides dette i forvejen fra tidligere forsøg med stoffet, kan forsøget indledes med den semikontinuerte metode, hvor en del af prøvevandet eller -opslæmningen udskiftes med mellemrum (jf. tillæg 2). I stedet kan det normale batchforsøg ændres til et semikontinuert forsøg, hvis der ikke er sket nogen nedbrydning af prøvestoffet efter ca. 60 dages testning med batchmetoden (jf. andet afsnit i punkt 1.8.8.3).

1.8.7. **Tilsætning af prøvestoffet (eller referencestoffet)**

For stoffer med stor vandopløselighed (> 1 mg/l) og lav flygtighed (Henrys konstant < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ eller < $10^{-5}$ $atm \cdot m^3/mol$) kan der fremstilles en stamopløsning i deioniseret vand (jf. punkt 1.8.2); en passende mængde stamopløsning tilsættes prøvebeholderne, så den ønskede koncentration opnås. Volumenet af den tilsatte stamopløsning bør holdes så lavt, som det er praktisk muligt (< 10 % af volumenet af den endelige opløsning, om muligt). En anden mulighed er at bruge et større volumen prøvevand til at opløse prøvestoffet, hvilket kan betragtes som et alternativ til brug af organiske opløsningsmidler.

▼M1

Hvis det ikke kan undgås, må stamopløsninger af ikke-flygtige stoffer med ringe vandopløselighed fremstilles ved hjælp af et flygtigt organisk opløsningsmiddel, men opløsningsmidlet må ikke tilsættes systemet i en mængde på over 1 % v/v og må ikke have negativ indvirkning på den mikrobielle aktivitet. Opløsningsmidlet må ikke påvirke prøvestoffets stabilitet i vand. Opløsningsmidlet skal fjernes, så der kun er en yderst ringe mængde tilbage, som ikke nævneværdigt øger DOC-indholdet i prøvevandet eller -suspensionen. Dette skal efterprøves ved stofspecifik analyse eller om muligt ved analyse for DOC (6). Det skal tilstræbes at begrænse den overførte mængde opløsningsmiddel til det absolut nødvendige og sikre, at den tilsatte mængde prøvestof er opløselig i det endelige volumen prøvevand. Tilsætning af prøvestoffet til prøvebeholderne kan ske ved hjælp af andre teknikker som beskrevet i (7) og (8). Når der bruges et organisk opløsningsmiddel til tilsætning af prøvestoffet, skal der køres opløsningsmiddelkontrolprøver, som indeholder prøvevandet (uden tilsætning) samt prøvevand tilsat referencestof, og som behandles på samme måde som aktive prøvebeholdere modificeret med prøvestof i stabiliserende opløsningsmiddel. Formålet med opløsningsmiddelkontrolprøverne er at undersøge eventuel negativ indvirkning af opløsningsmidlet på den mikrobielle population, således som dette kan konstateres ved nedbrydningen af referencestoffet.

1.8.8. **Forsøgsbetingelser**

1.8.8.1. *Forsøgstemperatur*

Inkubering skal enten ske i mørke (hvilket bør foretrækkes) eller i diffust lys ved kontrolleret temperatur (± 2 °C), som kan være felttemperaturen eller en standardtemperatur på 20-25 °C. Felttemperaturen kan enten være prøvens faktiske temperatur på prøvetagningstidspunktet eller en gennemsnitlig felttemperatur på prøvetagningsstedet.

1.8.8.2. *Omrøring*

Der skal sørges for konstant omrystning eller omrøring, så partikler og mikroorganismer holdes opslæmmet. Omrøringen fremmer desuden overførslen af oxygen fra prøvebeholderens headspace til væsken, så aerobe betingelser kan opretholdes. Kolberne anbringes i rystebord (ca. 100 omdrejninger/min.) eller forsynes med magnetomrører. Omrystning eller omrøring skal være kontinuerlig. Omrystning eller omrøring skal dog være så svag som muligt og samtidig opretholde en homogen opslæmning.

1.8.8.3. *Forsøgets varighed*

Forsøget bør normalt ikke strække sig over mere end 60 døgn, medmindre den semikontinuerte metode med periodisk udskiftning af prøvesuspensionen anvendes (jf. punkt 1.8.6 og tillæg 2). Er nedbrydningen af prøvestoffet begyndt i løbet af de første 60 dage, kan batchforsøget dog forlænges til maksimalt 90 dage. Nedbrydningen overvåges med passende tidsintervaller ved bestemmelse af $^{14}C$-residualaktivitet eller den udviklede $^{14}CO_2$ (jf. punkt 1.8.9.4) og/eller ved kemisk analyse (punkt 1.8.9.5). Inkubationstiden skal være tilstrækkeligt lang til, at nedbrydningsprocessen kan bedømmes. Nedbrydningsgraden skal helst være over 50 %. For langsomt nedbrydelige stoffer skal nedbrydningsgraden være tilstrækkelig (normalt mere end 20 % nedbrydning) til, at nedbrydningshastighedskonstanten kan bestemmes.

▼M1

Testsystemets pH og oxygenkoncentration skal måles periodisk, medmindre erfaringer fra tilsvarende tidligere forsøg med vand- og sedimentprøver indsamlet på samme sted gør sådanne målinger unødvendige. Under visse betingelser kan metaboliseringen af det primære substrat ved langt større koncentration i vand eller sediment muligvis medføre $CO_2$-udvikling og oxygenforbrug i et omfang, der ændrer forsøgsbetingelserne væsentligt.

1.8.9. **Fremgangsmåde**

1.8.9.1. *Klargøring af kolber til pelagisk forsøg*

Overfør en passende mængde af prøvevandet til prøvekolberne, højst en tredjedel af kolbens volumen og mindst ca. 100 ml. Også hvis der anvendes flere kolber (for at kunne høste en hel kolbe ved hvert prøvetagningstidspunkt), vil den mest hensigtsmæssige mængde prøvevand være ca. 100 ml, da små prøvevolumener kan påvirke lag-fasens varighed. Prøvestoffet tilsættes fra en stamopløsning som beskrevet i punkt 1.8.2 og 1.8.7. Der skal anvendes mindst to forskellige prøvestofkoncentrationer, der afviger indbyrdes med en faktor 5 til 10, for at nedbrydningskinetikken kan fastlægges og nedbrydningshastighedskonstanten beregnes. Begge de valgte koncentrationer skal være under 100 µg/l og helst i området < 1-10 µg/l.

Kolberne lukkes med propper eller låg, der er uigennemtrængelige for luft og $CO_2$. Til ikke-$^{14}$C-mærkede, ikke-flygtige prøvestoffer kan anvendes løse vatpropper, der beskytter mod kontaminering fra luften (jf. punkt 1.8.1), forudsat at alle vigtige nedbrydningsprodukter vides at være ikke-flygtige, og at der anvendes indirekte $CO_2$-bestemmelse (se tillæg 3).

Kolberne inkuberes ved den valgte temperatur (se punkt 1.8.8.1). Prøver til kemisk analyse eller $^{14}$C-måling udtages ved forsøgets begyndelse (dvs. før bionedbrydningen begynder, se punkt 1.7.1) og derefter med passende tidsintervaller i løbet af forsøget. Prøverne kan udtages som delprøver (f.eks. 5 ml aliquoter) fra hver replikat, eller ved at høste en hel kolbe på hvert prøvetagningstidspunkt. Mineraliseringen af prøvestoffet kan bestemmes enten indirekte eller direkte (se tillæg 3). Til pålidelig bestemmelse af hastighedskonstanten kræves sædvanligvis mindst fem prøvetagningspunkter i nedbrydningsfasen (dvs. efter at lag-fasen er slut), medmindre det for hurtigt nedbrydelige stoffer kan godtgøres, at tre prøvetagningspunkter er tilstrækkeligt. For ikke hurtigt nedbrydelige stoffer kan der let foretages flere målinger i nedbrydningsfasen, og der skal i så fald anvendes flere datapunkter til bestemmelse af k. En fast tidsplan for prøvetagningen kan ikke angives, da bionedbrydningshastigheden varierer. Ved langsom nedbrydning anbefales dog ugentlig prøveudtagning. Er prøvestoffet hurtigt nedbrydeligt, udtages prøver dagligt de første tre dage, derefter hver anden eller hver tredje dag. Under visse omstændigheder, således ved stoffer, der hydrolyseres meget hurtigt, kan det være nødvendigt at tage prøver en gang i timen. Inden forsøget gennemføres, anbefales det at udføre et indledende forsøg til bestemmelse af passende prøvetagningsintervaller. Hvis der skal være prøver til rådighed til nærmere specifik analyse, tilrådes det at tage ekstra prøver og derefter vælge dem, der skal analyseres, ved forsøgets slutning i henhold til en bagudrettet strategi, dvs. de sidste prøver analyseres først (se vejledningen i andet afsnit i punkt 1.8.9.5 vedrørende prøvernes stabilitet ved opbevaring).

▼**M1**

1.8.9.2. *Antal kolber og prøver*

Kør et tilstrækkeligt antal prøvekolber til, at der er:

— prøvekolber: mindst to kolber for hver prøvestofkoncentration (helst mindst tre), dog flere kolber for hver koncentration hvis der høstes hele prøvekolber (betegnet $F_T$) ved hvert prøvetagningstidspunkt

— prøvekolber til beregning af massebalance: mindst to kolber (betegnet $F_M$) for hver prøvekoncentration

— blindkontrol, intet prøvestof: mindst én blindprøvekolbe (betegnet $F_B$), kun indeholdende prøvevand

— referencekontrol: to kolber (betegnet $F_C$) med referencestof (f.eks. anilin eller natriumbenzoat i en koncentration af 10 µg/l). Formålet med referencekontrollen er at bekræfte et minimum af mikrobiel aktivitet. Hvis det er hensigtsmæssigt, kan der anvendes et radioaktivt mærket referencestof, også når nedbrydningen af prøvestoffet overvåges ved kemiske analyser

— steril kontrol: en eller to kolber (betegnet $F_S$) indeholdende steriliseret prøvevand, til undersøgelse af eventuel abiotisk nedbrydning eller anden ikke-biologisk bortfjernelse af prøvestoffet. Den biologiske aktivitet kan enten standses ved autoklavering (121 °C; 20 min.) af prøvevandet, ved tilsætning af et giftstof (f.eks. natriumazid ($NaN_3$) i en koncentration af 10-20 g/l, kviksølvchlorid ($HgCl_2$) i en koncentration af 100 mg/l eller formalin i en koncentration af 100 mg/l) eller ved gammabestråling. Anvendes $HgCl_2$, skal dette bortskaffes som giftigt affald. For vand med sediment tilsat i store mængder er det ikke let at opnå sterile forhold; i så fald anbefales gentagne autoklaveringer (f.eks. tre gange). Der må tages højde for, at autoklaveringen kan ændre sedimentets sorptionsegenskaber

— opløsningsmiddelkontroller indeholdende prøvevand og prøvevand med referencestof: dobbelt sæt kolber behandlet med samme mængde opløsningsmiddel og efter samme fremgangsmåde som ved tilsætning af prøvestoffet. Formålet hermed er at afsløre eventuelle skadelige virkninger af opløsningsmidlet ved bestemmelse af nedbrydningen af referencestoffet.

Ved forsøgets tilrettelæggelse må forsøgslederen veje betydningen af et øget antal forsøg op mod et øget antal prøvetagningstidspunkter. Det nøjagtige antal kolber, der er nødvendigt, afhænger af den anvendte metode til bestemmelse af nedbrydningen (se tredje afsnit i punkt 1.8.9.1, punkt 1.8.9.4 og tillæg 3).

▼**M1**

Der skal udtages to delprøver (f.eks. på 5 ml aliquoter) fra hver prøvekolbe på hvert prøvetagningstidspunkt. Anvendes mange kolber for at kunne høste hele kolber, skal der høstes mindst to kolber ved hvert prøvetagningstidspunkt (se første afsnit i punkt 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Klargøring af kolber til forsøg med opslæmmet sediment (valgfrit)*

Der tilsættes det nødvendige volumen prøvevand og, i givet fald, sediment, til prøvekarrene (se punkt 1.8.5). Klargøring af kolber til forsøg med opslæmmet sediment foretages som ved det pelagiske forsøg (se punkt 1.8.9.1 og 1.8.9.2). Der bør fortrinsvis anvendes serumflasker eller kolber af tilsvarende form. De lukkede kolber anbringes vandret på rystebord. Åbne kolber til ikke-$^{14}$C-mærkede, ikke-flygtige stoffer skal selvfølgelig anbringes stående; i så fald anbefales brug af magnetomrører og magneter overtrukket med glas. Om nødvendigt beluftes kolberne for at opretholde aerobe betingelser.

1.8.9.4. *Radiokemiske bestemmelser*

Den udviklede $^{14}CO_2$ bestemmes indirekte og direkte (se tillæg 3). $^{14}CO_2$ bestemmes indirekte ved forskellen mellem den initiale $^{14}$C-aktivitet i prøvevand eller -opslæmning og den totale residualaktivitet på prøvetagningstidspunktet, målt efter forudgående forsuring af prøven til pH 2-3 og fjernelse af $CO_2$. Derved er uorganisk kulstof fjernet, og den målte resterende aktivitet kommer fra organisk materiale. Indirekte $^{14}CO_2$-betemmelse bør ikke benyttes, hvis der dannes vigtige flygtige omdannelsesprodukter ved omdannelse af prøvestoffet (se tillæg 3). Om muligt bør $^{14}CO_2$-udviklingen måles direkte (se tillæg 3) i mindst én prøvekolbe ved hvert prøvetagningstidspunkt. Derved kan både massebalance og bionedbrydning kontrolleres, men dette kan kun lade sig gøre ved forsøg i lukkede kolber.

Måles den udviklede $^{14}CO_2$ direkte under forsøget, skal der ved forsøgets start opsættes ekstra kolber hertil. Direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse anbefales, hvis der dannes vigtige omdannelsesprodukter ved prøvestoffets omdannelse. Ved hvert målepunkt skal de ekstra flasker forsures til pH 2-3, og $^{14}CO_2$ opsamles i en intern eller ekstern absorber (se tillæg 3).

I stedet kan koncentrationen af $^{14}$C-mærket prøvestof og vigtige omdannelsesprodukter bestemmes ved radiokromatografi (f.eks. tyndtlagskromatografi, RAD-TLC) eller ved HPLC med radiokemisk detektion.

Det kan frit vælges, om man vil bestemme fasefordelingen af den resterende radioaktivitet (se tillæg 1) og resterende prøvestof og omdannelsesprodukter.

▼M1

Ved forsøgets slutning bestemmes massebalancen ved direkte $^{14}CO_2$-måling med separate prøvekolber, fra hvilke der ikke er udtaget nogen prøver under forsøget (se tillæg 3).

1.8.9.5. *Specifik kemisk analyse*

Er en følsom specifik analysemetode til rådighed, kan den primære bionedbrydning bestemmes ved måling af den totale residualkoncentration af prøvestoffet i stedet for ved brug af radioaktiv mærkning. Anvendes et radioaktivt mærket prøvestof (til måling af total mineralisering), kan der ved sideløbende specifikke kemiske analyser fås værdifulde supplerende oplysninger og efterprøvning af metoden. Specifik kemisk analyse kan desuden anvendes til bestemmelse af omdannelsesprodukter, der dannes ved nedbrydning af prøvestoffet; dette anbefales for stoffer, der mineraliseres med en halveringstid på over 60 dage. For hvert prøvetagningstidspunkt måles og rapporteres koncentrationen af prøvestof og omdannelsesprodukter (som koncentration og som procent af tilført mængde). Generelt kræves et omdannelsesprodukt identificeret, hvis det på noget prøvetagningstidspunkt forefindes i en koncentration ≥ 10 % af den tilførte koncentration, medmindre andet med rimelighed kan begrundes. Ligeledes må det overvejes at identificere omdannelsesprodukter, hvis koncentration stiger konstant under forsøget, også selv om koncentrationen ikke overstiger den nævnte grænse, da dette kan være et tegn på, at de persisterer. Hvis prøvestoffet kan tænkes at være genstand for hurtig abiotisk omdannelses (f.eks. hydrolyse), må det overvejes at analysere for omdannelsesprodukterne i sterile kontroller. Nødvendigheden af kvantificering og identifikation af omdannelsesprodukter må vurderes konkret i det enkelte tilfælde, og begrundelser gives i rapporten. Ekstraktion med organisk opløsningsmiddel skal anvendes i henhold til anvisningerne i den pågældende analysemetode.

Alle prøver skal opbevares ved 2 til 4 °C i lufttæt emballage, hvis analysen foretages inden for 24 timer (hvilket må foretrækkes). Ved længere opbevaring skal prøverne fryses ved en temperatur under –18 °C eller konserveres kemisk. Forsuring kan ikke anbefales som konserveringsmetode, da forsurede prøver kan være ustabile. Hvis prøverne ikke analyseres inden for 24 timer, men skal opbevares længere, skal der udføres et forsøg, der godtgør stabiliteten af de betragtede stoffer ved opbevaring under –18 °C eller i konserveret tilstand. Omfatter analysemetoden enten ekstraktion med opløsningsmiddel eller fastfase-ekstraktion (SPE), skal ekstraktionen finde sted straks efter prøvetagning eller efter højst 24 timers opbevaring af prøven i nedkølet tilstand.

Afhængigt af analysemetodens følsomhed kan større prøvevolumener end angivet i punkt 1.8.1 være nødvendige. Forsøget kan let udføres med et prøvevolumen på én liter i kolber med et volumen på 2-3 liter, hvorved der kan udtages prøver på ca. 100 ml.

▼M1

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. BEHANDLING AF RESULTATER

2.1.1. **Grafisk fremstilling af data**

Alle prøvetagningstidspunkter afrundes til hele timer (medmindre stoffet nedbrydes væsentligt inden for minutter til timer), men ikke til hele døgn. Der optegnes en kurve over prøvestoffets beregnede residualaktivitet (for $^{14}C$-mærkede prøvestoffer) eller residualkoncentration (for umærkede stoffer) som funktion af tiden i både lineær og semilogaritmisk afbildning (se figur 1a og 1b). Har nedbrydning fundet sted, sammenholdes resultaterne for kolber $F_T$ med resultaterne for kolber $F_S$. Hvis der er mindre end 10 % forskel mellem gennemsnitsresultaterne for kolberne med prøvestof ($F_T$) og de sterile kolber ($F_S$), kan den iagttagne nedbrydning antages at være overvejende abiotisk. Hvis nedbrydningen i kolberne $F_S$ er mindre, kan disse tal benyttes til at korrigere tallene for kolberne $F_T$ (ved fratrækning) for at beregne omfanget af bionedbrydningen. Når der foretages valgfrie analyser for vigtige nedbrydningsprodukter, skal der forelægges grafiske kurver over deres dannelse og aftagen foruden en kurve over faldet i prøvestofindholdet.

Lag-fasens varighed $t_L$ beregnes af nedbrydningskurven (semilogaritmisk afbildning) ved at ekstrapolere kurvens lineære del til et punkt svarende til en nedbrydning lig nul eller i stedet ved at bestemme tiden svarende til en nedbrydning på ca. 10 % (se figur 1a og 1b). Af den semilogaritmiske afbildning bestemmes første ordens hastighedskonstanten k og middelfejlen på denne ved lineær regression på kurven over ln ($^{14}C$-residualaktivitet eller prøvestofkoncentration) som funktion af tiden. Navnlig for $^{14}C$-målinger må der kun anvendes data hørende til kurvens første lineære del, der følger efter lag-fasens slutning, og der må gives præference til nogle få udvalgte, repræsentative data frem for et større antal mere usikre data. Usikkerheden indbefatter her de naturlige fejl i den anbefalede direkte brug af målt $^{14}C$ residualaktivitet (se nedenfor). Hvis nedbrydningen følger et bifasisk mønster, kan det undertiden være relevant at beregne to forskellige hastighedskonstanter. Hertil defineres to forskellige faser af nedbrydningskurven. Hastighedskonstanten k og halveringstiden $t_{½} = \ln 2/k$ beregnes for hver enkelt af de replikate kolber, når der er udtaget delprøver fra samme kolbe, eller ved hjælp af gennemsnitsværdier, når der høstes hele kolber på hvert prøvetagningstidspunkt (se sidste afsnit i punkt 1.8.9.2). Ved førstnævnte fremgangsmåde skal hastighedskonstant og halveringstid rapporteres for hver enkelt replikat kolbe og som gennemsnitsværdi med middelfejl. Er der anvendt høje koncentrationer af prøvestoffet, kan nedbrydningskurven afvige betydeligt fra den rette linje (i semilogaritmisk afbildning), og der gælder ikke nødvendigvis første ordens kinetik. Det har derfor ingen mening at fastlægge en halveringstid. For et begrænset dataområde kan man dog anvende pseudo første ordens kinetik og beregne halveringstiden $DT_{50}$ for nedbrydningen (den tid, der medgår til 50 % nedbrydning). Man må dog være opmærksom på, at nedbrydningens tidsforløb uden for det valgte dataområde ikke kan forudsiges ved hjælp af $DT_{50}$, der blot er en deskriptor for et givet datasæt. Der findes let tilgængelige analyseredskaber, som letter statistiske beregninger og kurvefitting, og brug af sådan software anbefales.

▼M1

Foretages der specifikke kemiske analyser, beregnes hastighedskonstanter og halveringstider for primær nedbrydning som beskrevet ovenfor for total mineralisering. Hvis den primære nedbrydning udgør den hastighedsbegrænsende proces, kan der undertiden anvendes datapunkter fra hele nedbrydningsforløbet. Dette skyldes, at målingerne er direkte, i modsætning til målingerne af $^{14}C$-aktivitet.

Anvendes $^{14}C$-mærkede stoffer, skal der opstilles en massebalance i procent af den tilsatte startkoncentration, i det mindste ved forsøgets slutning.

2.1.2. **Residualaktivitet**

Ved bionedbrydning af den $^{14}C$-mærkede del af et organisk stof omdannes størstedelen af $^{14}C$ til $^{14}CO_2$, mens en anden del udnyttes til vækst af biomasse og/eller syntese af ekstracellulære metabolitter. »Fuldstændig« biologisk nedbrydning af et stof medfører derfor ikke 100 % omdannelse af kulstofindholdet til $^{14}CO_2$. Den $^{14}C$, der indbygges i produkter dannet ved biosyntese, frigives efterfølgende langsomt som $^{14}CO_2$ ved »sekundær mineralisering«. Kurver, der viser residualaktiviteten af organisk $^{14}C$ (målt efter fjernelse af $CO_2$) eller den producerede $^{14}CO_2$ som funktion af tiden, har derfor en »hale«, efter at nedbrydningen er løbet til ende. Dette komplicerer den kinetiske fortolkning af data, og til dette formål bør kun den initiale del af kurven (efter lag-fasens afslutning, og inden ca. 50 % nedbrydning er nået) normalt anvendes til beregning af en hastighedskonstant for nedbrydningen. Hvis prøvestoffet nedbrydes, er den totale organiske $^{14}C$-residualaktivitet altid større end den $^{14}C$-aktivitet, der skyldes tilbageværende intakt prøvestof. Hvis prøvestoffet nedbrydes ved en første ordens reaktion, og en konstant brøkdel α mineraliseres til $CO_2$, vil den initiale hældning af $^{14}C$-depletionskurven (total organisk $^{14}C$ som funktion af tiden) være α gange hældningen af den tilsvarende kurve over koncentrationen af prøvestoffet (eller, mere præcist, den del af prøvestoffet, der er mærket med $^{14}C$). Hvis målingerne af den totale organiske $^{14}C$-aktivitet bruges uden korrektion, vil hastighedskonstanten for nedbrydningen derfor være lavt regnet. I litteraturen er beskrevet metoder til bestemmelse af prøvestofkoncentrationen ud fra den målte radiokemiske aktivitet ved brug af nogle forenklede forudsætninger (2)(9)(10)(11). Sådanne metoder kan lettest anvendes på hurtigt nedbrydelige stoffer.

2.2. FORTOLKNING AF RESULTATER

Hvis k findes at være uafhængig af den tilsatte koncentration (dvs. den beregnede k-værdi er omtrent ens ved forskellige prøvestofkoncentrationer), kan første ordens hastighedskonstanten antages at være repræsentativ for de anvendte prøvebetingelser, dvs. prøvestoffet, vandprøven og forsøgstemperaturen. I hvilket omfang resultaterne kan generaliseres eller ekstrapoleres til andre systemer, kræver det ekspertviden at vurdere. Anvendes en høj prøvestofkoncentration, så nedbrydningen ikke følger første ordens kinetik, kan data ikke benyttes til direkte beregning af en første ordens hastighedskonstant eller en tilsvarende halveringstid. Dog vil data fra forsøg med høj prøvestofkoncentration stadig være nyttige til beregning af den totale mineraliseringsgrad og/eller detektion og kvantificering af omdannelsesprodukter.

▼M1

Hvis man kender tabsprocenten fra andre tabsprocesser end bionedbrydning (f.eks. hydrolyse eller fordampning), kan de trækkes fra de nettotab, der iagttages under forsøget, hvorved man kan få en tilnærmet bestemmelse af bionedbrydningshastigheden. Data for hydrolyse vil kunne fås fra f.eks. den sterile kontrol eller fra sideløbende forsøg med højere prøvestofkoncentration.

Indirekte og direkte bestemmelse af $^{14}CO_2$ (punkt 1.8.9.4 og tillæg 3) kan kun bruges til at bestemme graden af prøvestoffets mineralisering til $CO_2$. Koncentrationen af $^{14}C$-mærket prøvestof og dannelsen af vigtige omdannelsesprodukter (tredje afsnit i punkt 1.8.9.4) kan analyseres ved radiokromatografi (RAD-TLC) eller HPLC. For at halveringstiden kan bestemmes direkte, må der ikke være vigtige omdannelsesprodukter (defineret som ≥ 10 % af den tilsatte mængde prøvestof) til stede. Hvis der er vigtige omdannelsesprodukter, som her defineret, til stede, er en detaljeret vurdering af data nødvendig. En sådan vurdering kan bestå i yderligere undersøgelser og/eller identifikation af omdannelsesprodukterne (se første afsnit i punkt 1.8.9.5), medmindre disses skæbne med rimelig sikkerhed kan vurderes ud fra tidligere erfaringer (f.eks. oplysninger om nedbrydningsvej). Da den andel af prøvestoffets kulstofindhold, der omdannes til $CO_2$, er forskellig (hovedsagelig afhængig af koncentrationen af prøvestoffet og øvrige tilgængelige substrater, prøvebetingelserne og det mikrobielle miljø), giver forsøget ikke umiddelbar mulighed for beregning af den endelige bionedbrydning som i et DOC die-away forsøg, men resultatet svarer til det, der fås af et respirometrisk forsøg. Mineraliseringsgraden vil således højst være lig med minimumsniveauet af fuldstændig bionedbrydning. For at få et mere fyldestgørende billede af den fuldstændige bionedbrydning (mineralisering og inkorporation i biomasse) bør analysen af fasefordelingen af $^{14}C$ foretages ved forsøgets slutning (se tillæg 1).$^{14}C$-indholdet i den samlede partikelmængde vil dels bestå af $^{14}C$ indbygget i bakteriel biomasse, dels $^{14}C$ sorberet til organiske partikler.

2.3. FORSØGETS VALIDITET

Hvis referencestoffet ikke nedbrydes inden for det forventede tidsrum (for anilin og natriumbenzoat sædvanligvis mindre end to uger), er forsøgets validitet tvivlsom og må nærmere efterprøves, eller forsøget må i stedet gentages med en ny vandprøve. I en ISO ringtest af metoden med deltagelse af syv laboratorier beliggende forskellige steder i Europa lå hastighedskonstanten for nedbrydning af anilin efter tilpasning mellem 0,3 og 1,7 $dag^{-1}$ med et gennemsnit på 0,8 $d^{-1}$ ved 20 °C og en middelfejl på ± 0,4 $d^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 dag). Typiske lag-tider var 1 til 7 dage. De undersøgte vande rapporteredes at have en bakteriel biomasse svarende til $10^3$-$10^4$ kolonidannende enheder (CFU) pr. ml. Nedbrydningshastigheden i næringsstofrige mellemeuropæiske vande var større end i oligotrofe nordiske vande, hvilket kan skyldes forskelle i trofisk status eller tidligere eksponering for kemiske stoffer.

Den totale genfinding (ved massebalance) ved forsøgets slutning bør være mellem 90 % og 110 % for radioaktivt mærkede stoffer, mens den initiale genfinding ved forsøgets begyndelse bør være mellem 70 % og 110 % for umærkede stoffer. De angivne områder må imidlertid kun opfattes som mål og bør ikke anvendes som acceptkriterier for testen.

▼M1

3. **FORSØGSRAPPORT**

Undersøgelsens art, dvs. pelagisk eller med opslæmmet sediment, skal klart angives i forsøgsrapporten, som desuden skal indeholde i det mindste følgende oplysninger:

For prøvestof og referencestof(fer):

— generisk navn, kemisk navn, (anbefalet IUPAC og/eller CAS navn), CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af $^{14}C$, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber (se punkt 1.5 og 1.6)

— kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel (med angivelse af placeringen af $^{14}C$, når radioaktivt mærket stof anvendes) og relevante fysisk-kemiske egenskaber for stoffer anvendt som standarder til identifikation og kvantificering af omdannelsesprodukter

— renhed (urenheder) af prøve- og referencestof

— for mærkede stoffer, radiokemisk renhed og specifik aktivitet (når det er relevant).

For overfladevand:

Der skal som minimum gives følgende oplysninger om den udtagne vandprøve:

— beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening

— dato og klokkeslæt for indsamling af prøven

— næringsstofindhold (total N, ammonium, nitrit, nitrat, total P, opløst orthophosphat)

— prøvetagningsdybde

— prøvens udseende (f.eks. farve og turbiditet)

— DOC og TOC

— BOD

— temperatur og pH på prøvetagningsstedet og -tidspunktet

— oxygen- eller redoxpotentiale (kun nødvendigt, hvis der ikke tydeligt ses at være aerobe betingelser)

— saltindhold eller ledeevne (for søvand og brakvand)

— opslæmmet faststof (for uklare prøver)

— eventuelle andre relevante oplysninger om prøvetagningsstedet på prøvetagningstidspunktet (f.eks. aktuelle eller historiske oplysninger om strømhastigheden i vandløb eller havstrømme, nærliggende større udledninger og udledningernes art, vejrforholdene i tiden forud for prøvetagningen)

og, valgfrit:

— mikrobiel biomasse (f.eks. direkte tælling med acridinorangefarvning, eller kolonidannende enheder)

▼**M1**

— uorganisk kulstof

— koncentration af chlorophyll-a som specifik bestemmelse af algebiomasse.

Hvis forsøget udføres med opslæmmet sediment, skal der desuden gives følgende oplysninger om sedimentet:

— prøvetagningsdybde for sedimentet

— sedimentets fremtræden (som f.eks. farvet, mudret, siltholdig eller sandholdig)

— tekstur (f.eks. angivet som % groft sand, fint sand, silt og ler)

— tør vægt af opslæmmet faststof i g/l, TOC-koncentration eller vægttab ved forbrænding som mål for indholdet af organisk stof

— pH

— oxygen- eller redoxpotentiale (kun nødvendigt, hvis der ikke tydeligt ses at være aerobe betingelser).

Forsøgsbetingelser:

— forsinkelse mellem indsamling og anvendelse i laboratorieforsøget, opbevaring og forbehandling af prøven, dato for undersøgelserne

— mængde prøvestof tilført, koncentration under forsøget og referencestof

— tilsætningsmetode for prøvestoffet, herunder brug af eventuelt opløsningsmiddel

— anvendt volumen overfladevand og sediment (hvis anvendt), og volumen udtaget til analyse ved hvert prøvetagningstidspunkt

— beskrivelse af det anvendte prøvesystem.

Hvis forsøget ikke udføres i mørke, oplysninger om betingelserne »diffus belysning«:

— oplysninger om den eller de anvendte metoder til sterilisering af kontrolprøver (f.eks. autoklaveringstemperatur og -tid samt antal autoklaveringer)

— inkubationstemperatur

— oplysninger om analyseteknik og metode(r) anvendt til radiokemiske målinger samt til kontrol af massebalance og målinger af fasefordeling (hvis sådanne er udført)

— antal gentagelser.

Resultater:

— genfindingsprocenter (se punkt 1.7.1)

— reproducerbarhed og følsomhed af de anvendte analysemetoder, herunder detektionsgrænse (LOD) og kvantificeringsgrænse (LOQ) (se punkt 1.7.2)

▼M1

— alle målte data (herunder prøvetagningstidspunkter) og beregnede værdier i tabelform og nedbrydningskurver; for hver prøvekoncentration og for hver replikat kolbe angives den lineære korrelationskoefficient for kurvehældningen i logaritmisk afbildning, den beregnede lag-fase og en første ordens eller pseudo første ordens hastighedskonstant (hvis dette er muligt) samt den tilsvarende nedbrydningshalveringstid ($t_{50}$)

— relevante værdier angives som gennemsnit af de værdier, der er iagttaget i de enkelte replikater, f.eks. lag-fasens varighed, nedbrydningshastighedskonstanten og nedbrydningshalveringstiden ($t_{50}$)

— systemet rubriceres enten som ikke tilpasset eller tilpasset, bedømt ud fra nedbrydningskurvens udseende og ud fra den mulige indvirkning af prøvekoncentrationen

— resultaterne af den endelige massebalancekontrol og resultaterne af eventuelle fasefordelingsmålinger

— den andel af $^{14}C$, der er mineraliseret, og, når specifikke analyser anvendes, den endelige primære nedbrydningsgrad

— identifikation, molær koncentration og procentdel tilsat stof og, når det er relevant, vigtige omdannelsesprodukter (se første afsnit i punkt 1.8.9.5)

— formodet omdannelsesvej, når det er relevant

— diskussion af resultater.

4. **LITTERATUR**

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592-1 (1999) Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Prøvemetode C.23. Aerob og anaerob omdannelse i jord.

4. Prøvemetode C.24. Aerob og anaerob omdannelse i akvatiske sedimentsystemer.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22.

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394-401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of $^{14}C$-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

11. ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

*Tillæg 1*

**Fasefordeling af $^{14}C$**

Til kontrol af metoden skal rutinemålingerne af total organisk $^{14}C$-residualaktivitet (TOA) suppleres med massebalancemålinger, hvor den udviklede $^{14}CO_2$ bestemmes direkte efter opsamling i absorber (se tillæg 3). Positiv $^{14}CO_2$-dannelse er i sig selv et direkte tegn på bionedbrydning i modsætning til abiotisk nedbrydning eller andre tabsmekanismer som fordampning og sorption. Andre nyttige oplysninger til karakterisering af bionedbrydningsegenskaberne kan fås af målinger af fordelingen af TOA på opløst tilstand (opløst organisk $^{14}C$-aktivitet, DOA) og fast partikelform (POA) efter separation af partiklerne ved membranfiltrering eller centrifugering. POA består af prøvestof, der er sorberet på den mikrobielle biomasse og på andre partikler samt af kulstof fra prøvestoffet, der er anvendt til syntese af nyt cellemateriale og derved indbygget i den partikelformige biomassefraktion. Dannelsen af opløst organisk $^{14}C$ kan bestemmes som DOA, når bionedbrydningen er slut (svarende til plateauet af kurven over nedbrydningen som funktion af tiden).

Fasefordelingen af residual-$^{14}C$ i udvalgte prøver bestemmes ved filtrering af prøven på et 0,22 μm eller 0,45 μm membranfilter af et materiale, der ikke adsorberer nævneværdige mængder prøvestof (polycarbonatfiltre kan være egnede). Er sorptionen af prøvestoffet på filteret for stor til at kunne ignoreres (dette skal verificeres inden forsøget), kan højhastighedscentrifugering (2 000 g; 10 min.) anvendes i stedet for filtrering.

Derefter behandles filtratet eller centrifugatet som beskrevet i tillæg 3 for ufiltrerede prøver. Membranfiltratet opløses i en egnet scintillationsvæske og tælles på sædvanlig måde, idet korrektion for quenching normalt kun foretages ved hjælp af kanalforholdet for ekstern standard eller behandling af prøverne med et blegemiddel. Er der anvendt centrifugering, skal den pellet, der er dannet af partikelfraktionen, genopslæmmes i 1-2 ml destilleret vand og overføres til et scintillationsglas. Derefter vaskes to gange med 1 ml destilleret vand, og vaskevandet overføres til scintillationsglasset. Opslæmningen kan om nødvendigt indlejres i en gel til væskescintillationstælling.

▼M1

*Tillæg 2*

**Semikontinuert metode**

Vanskelige stoffer kan kræve inkubation i indtil flere måneder for at opnå tilstrækkelig nedbrydning. Forsøget bør normalt ikke vare over 60 dage, medmindre den normale vandprøves egenskaber opretholdes ved udskiftning af prøveopslæmningen. Er nedbrydningen af prøvestoffet begyndt inden for de første 60 dage, kan forsøget dog forlænges til maksimalt 90 dage, uden at forsøgsopslæmningen udskiftes.

Ved langvarig inkubation kan mangfoldigheden af det mikrobielle samfund blive nedsat som følge af forskellige tabsmekanismer og muligvis opbrugning af essentielle næringsstoffer og primære kulstofsubstrater i vandprøven. Derfor anbefales det at anvende en semikontinuert metode for at få tilfredsstillende bestemmelse af nedbrydningshastigheden for langsomt nedbrydelige stoffer. Den semikontinuerte metode bør anvendes fra forsøgets start, hvis tidligere erfaring viser, at der kræves en inkubationsperiode på tre måneder for at opnå 20 % nedbrydning af stoffet. En anden mulighed er, at det normale batchforsøg ændres til et semikontinuert forsøg, hvis der ikke er sket nogen nedbrydning af prøvestoffet, efter at forsøget har kørt i ca. 60 dage med batchmetoden. Den semikontinuerte udførelse af forsøget kan standses og forsøget fortsættes som et batchforsøg, når der er konstateret en væsentlig nedbrydning (f.eks. > 20 %).

I det semikontinuerte forsøg udskiftes ca. en tredjedel af forsøgsopslæmningens volumen hver anden uge med friskindsamlet vand, som er tilsat prøvestof svarende til initialkoncentrationen. Anvendes den valgfrie metode med opslæmmet sediment, skal udskiftningsvandet desuden tilsættes sediment svarende til initialkoncentration (mellem 0,01 og 1 g/l). Udføres forsøget med opslæmmet sediment, er det vigtigt, at systemet holdes fuldstændig opslæmmet, også mens vandet skiftes, og at der er samme opholdstid for faste stoffer og for vand, da man ellers ikke opnår den tilsigtede overensstemmelse med et homogent vandigt system uden fastliggende faser. Af disse grunde bør initialkoncentrationen af opslæmmet sediment helst være i den nedre del af det foreskrevne interval, når den semikontinuerte metode anvendes.

Den angivne tilsætning af prøvestof forudsætter, at den delvise udskiftning af prøveopslæmningen ikke medfører overskridelse af den initiale prøvestofkoncentration, for at man skal undgå den tilpasning, der ofte ses ved høje prøvestofkoncentrationer. Da metoden både indebærer re-inokulering og kompensation for opbrugte næringsstoffer og primære substrater, genetableres den oprindelige mikrobielle mangfoldighed, og forsøget kan i princippet forlænges ubegrænset. Når den semikontinuerte metode anvendes, at det vigtigt at bemærke, at residualkoncentrationen af prøvestoffet skal korrigeres for de mængder prøvestof, der tilsættes og fjernes ved hver udskiftningsgang. For stoffer, der kun udviser ringe sorption, kan man frit vælge, om man vil bruge totalkoncentrationen eller den opløste koncentration af prøvestoffet. Sorptionen er uden betydning (< 5 %) ved de foreskrevne betingelser (0,1-1 g faststof/l) for stoffer med log $K_{ow}$ < 3 (gælder for neutrale, lipofile forbindelser). Dette illustreres af følgende beregningseksempel. 0,1 g faststof /l svarer til ca. 10 mg kulstof pr. liter (ved en vægtbrøk kulstof, $f_C$ = 0,01). Idet det forudsættes, at

Log $K_{ow}$ (for prøvestoffet) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Fordelingskoefficient, $K_d = f_C \times K_{oc}$

Vil den opløste andel af totalkoncentrationen (C-water ($C_w$)/C-total ($C_t$) være:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

*Tillæg 3*

**Bestemmelse af $^{14}CO_2$**

**Indirekte $^{14}CO_2$-bestemmelse**

Til rutinemæssige målinger er indirekte bestemmelse normalt den mindst tidskrævende og mest nøjagtige metode, når prøvestoffet er ikke-flygtigt og ikke omdannes til flygtige omdannelsesprodukter. De ufiltrerede prøver overføres simpelthen til scintillationsglas, f.eks. i en mængde af 5 ml. En passende initial aktivitet i prøverne er 5 000 dpm-10 000 dpm (80-170 Bq), og en mindste initial aktivitet er ca. 1 000 dpm. $CO_2$-indholdet fjernes efter forsuring til pH 2-3 med 1-2 dråber koncentreret $H_3PO_4$ eller HCl. $CO_2$ -fjernelse kan ske ved gennembobling med luft i ½-1 time. I stedet kan glassene omrystes kraftigt i 1-2 timer (f.eks. på en mikropladeryster) eller med svagere omrystning natten over. Effektiviteten af $CO_2$-fjernelsen skal kontrolleres (ved forlængelse af beluftnings- eller omrystningsperioden). Der tilsættes derefter en scintillationsvæske egnet til tælling af vandige prøver, prøven homogeniseres i en omrører, og radioaktiviteten måles med væskescintillationstælling, idet man fratrækker den baggrundsaktivitet, der er fundet i blindprøverne ($F_B$). Medmindre prøvevandet er stærkt farvet eller har et højt partikelindhold, vil prøverne normalt udvise ensartet quenching, og det vil være tilstrækkeligt at korrigere for quenching ved hjælp af en ekstern standard. Hvis prøvevandet er stærkt farvet, kan det være nødvendigt at tilsætte en intern standard til at korrigere for quenching. Er partikelkoncentrationen høj, kan det være umuligt at få en homogen opløsning eller gel, eller prøverne vil udvise store forskelle i quenching. I så fald kan man benytte den tællemetode, der er beskrevet nedenfor for prøveslam. Udføres forsøget med opslæmmet sediment, kan $^{14}CO_2$ måles indirekte ved udtagning af en homogen 10 ml prøve af prøvevand/prøveopslæmning og adskillelse af faserne ved centrifugering med passende hastighed (f.eks. 40 000 $m/s^2$ i 15 min.). Den vandige fase behandles derefter som ovenfor beskrevet. $^{14}C$-aktiviteten i partikelfasen (POA) bestemmes ved genopslæmning af sedimentet i et lille volumen destilleret vand, overførsel til scintillationsglas og tilsætning af scintillationsvæske, så der dannes en gel (særlige scintillationsvæsker fås hertil). Alt efter partiklernes beskaffenhed (f.eks. indholdet af organisk stof) kan det være en fordel at behandle prøven natten over med et vævsopløsende middel og derefter homogenisere den i en omrører, før scintillationsvæsken tilsættes. I stedet kan POA bestemmes ved forbrænding i overskud af oxygen ved hjælp af en oxidiser. Ved tællingen skal der altid medtages interne standarder, og det kan være nødvendigt at korrigere hver enkelt prøve for quenching ved tilsætning af intern standard.

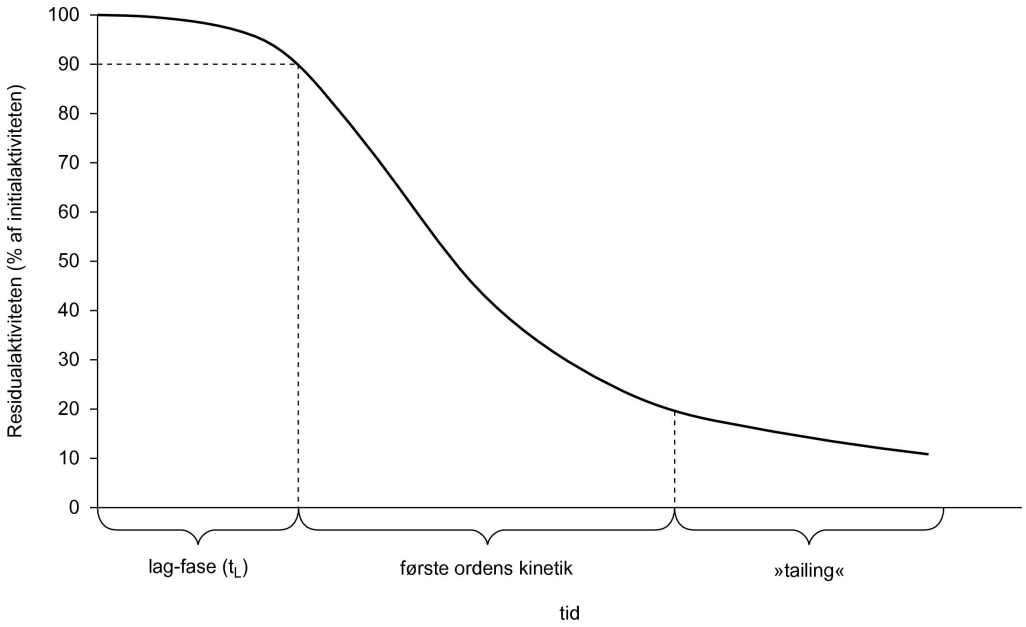
**Direkte $^{14}CO_2$-bestemmelse**

Hvis den udviklede $^{14}CO_2$ måles direkte, skal det ske ved at opsætte ekstra kolber ved forsøgets begyndelse og høste prøvekolberne i hvert målepunkt ved forsuring af kolberne til pH 2-3 og indsamling af $^{14}CO_2$ i en intern (anbragt i hver prøvekolbe ved forsøgets begyndelse) eller ekstern absorber. Som absorptionsmiddel kan enten anvendes alkali (f.eks. 1 N NaOH-opløsning eller en NaOH-pellet), ethanolamin eller en ethanolamin-baseret absorber, eller andre gængse absorbere. Til direkte måling af $^{14}CO_2$ skal kolberne lukkes med septa f.eks. af butylgummi.

▼**M1**

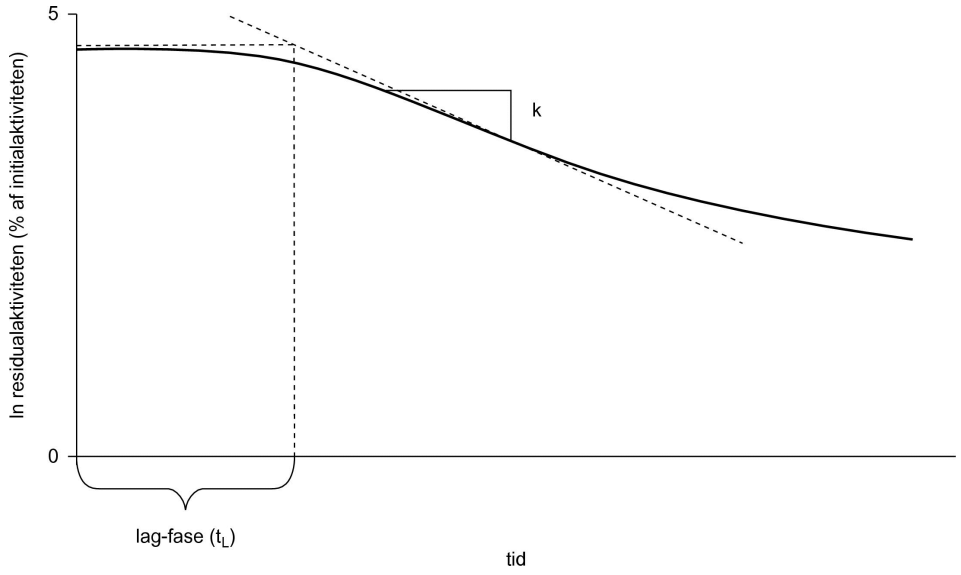
*Figur 1a*

**Eksempel på aritmetisk kurve over data (residualaktiviteten som funktion af tiden)**




*Figur 1b*

**Eksempel på semilogaritmisk kurve over data (ln til residualaktiviteten som funktion af tiden)**



▼M1

## C.26. *LEMNA* SP. VÆKSTHÆMNINGSTEST

### 1. METODE

Metoden er ækvivalent med OECD TG 221 (2006) (1). Der er opnået bred tilslutning blandt EU's myndigheder til, at Lemna-testen er et velegnet alternativ til en algetest for stærkt farvede stoffer (2)(3).

### 1.1. INDLEDNING

Formålet med nærværende testmetode er at vurdere stoffers toksicitet over for akvatiske ferskvandsplanter af slægten *Lemna* (andemad). Den er baseret på eksisterende retningslinjer (4)(5)(6)(7)(8)(9), men der er foretaget ændringer, som afspejler den senere tids forskning og drøftelser vedrørende en række vigtige punkter. Den foreslåede metode er blevet valideret ved en international ringtest (10).

I denne testmetode beskrives toksicitetstestning med *Lemna gibba* og *Lemna minor*, der begge har været genstand for omfattende undersøgelser og er omhandlet i ovennævnte standarder. Taksonomien for *Lemna* spp. er vanskelig, idet den kompliceres af, at der findes en bred vifte af fænotyper. Genetisk variation i responsen på giftstoffer hos *Lemna* kan forekomme, men de aktuelt foreliggende oplysninger om denne kilde til variation er utilstrækkelige som grundlag for at anbefale en bestemt klon til brug i nærværende testmetode. Det skal bemærkes, at testen ikke udføres axenisk, men nogle af testprocessens trin er foranstaltninger, der skal holde kontamineringen med andre organismer nede på et minimum.

Der gives en nærmere beskrivelse af testning med udskiftning af substratet (semistatisk forsøg og gennemstrømningsforsøg) og uden udskiftning (statisk). Afhængigt af målsætningen for testen og myndighedernes krav anbefales det at overveje brug af den semistatiske metode og gennemstrømningsmetoden f.eks. til stoffer, der hurtigt forlader opløsningen ved fordampning, fotonedbrydning, udfældning eller bionedbrydning. Nærmere anvisninger er givet i (11).

### 1.2. DEFINITIONER

Følgende definitioner og forkortelser anvendes i denne testmetode:

**Biomasse**: den tørre vægt af det levende materiale, som er til stede i en population. I denne test måles typisk surrogater for biomasse, f.eks. bladantal eller bladareal, og betegnelsen »biomasse« benyttes således også for sådanne surrogater.

**Chlorose**: gulning af bladvæv.

**Klon**: en organisme eller celle, der er opstået af en enkelt celle ved vegetativ formering. Individer fra samme klon er derfor genetisk identiske.

**Koloni**: en samling af moder- og datterblade (sædvanligvis 2 til 4), der sidder fast på hinanden. Betegnes undertiden en plante.

▼M1

**$EC_x$**: den koncentration af teststof opløst i testsubstratet, der medfører en væksthæmning på x % (f.eks. 50 %) af *Lemna* i løbet af en nærmere bestemt eksponeringsperiode (som udtrykkeligt skal angives, hvis den er forskellig fra den fulde eller normale testperiode). For klart at skelne mellem EC-værdier afledt af henholdsvis vækshastighed og udbytte anvendes betegnelsen »$E_rC$« for vækshastighed (rate) og »$E_yC$« for udbytte (yield), efterfulgt af den anvendte målevariabel, f.eks. »$E_rC$ (bladantal)«.

**Gennemstrømningstest**: en test, hvor testopløsningen udskiftes kontinuerligt.

**Blad**: en individuel/enkelt »bladlignende« struktur hos andemadplanten. Det er den mindste enhed, dvs. det mindste individ, der kan formere sig.

**Opsvulmethed**: blade, der fremtræder udbulede eller opsvulmede.

**Vækst**: en stigning i en målevariabel i løbet af testperioden, f.eks. bladantal, tør vægt, våd vægt eller bladareal.

**Væksthastighed (gennemsnitlig specifik væksthastighed)**: den logaritmiske biomasseforøgelse i eksponeringsperioden.

**Laveste koncentration med observeret effekt (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC)**: den laveste testede koncentration, ved hvilken stoffet har vist statistisk signifikant ($p < 0,05$) vækstnedsættende virkning i forhold til kontrolprøverne inden for en given eksponeringsperiode. Alle testkoncentrationer over LOEC skal dog have en skadelig virkning mindst svarende til den, der iagttages ved LOEC. Kan disse to betingelser ikke opfyldes, skal der fyldestgørende redegøres for, hvordan den pågældende LOEC (og dermed NOEC) er valgt.

**Målevariabler**: enhver type variabel, der måles for at udtrykke endepunktet for en test ved hjælp af en eller flere forskellige responsvariabler. I denne metode er bladantal, bladareal, frisk vægt og tør vægt målevariabler.

**Monokultur**: en kultur med én planteart.

**Nekrose**: dødt (dvs. hvidt eller gennemblødt) bladvæv.

**Nuleffekt-koncentration (No Observed Effect Concentration, NOEC)**: testkoncentrationen umiddelbart under LOEC.

**Fænotype**: de observerbare kendetegn for en organisme, som er bestemt af samspillet mellem dens gener og dens omgivelser.

**Responsvariabler**: variabler, som anvendes til vurdering af den toksiske virkning og er afledt af målte parametre, der beskriver biomassen ved forskellige beregningsmetoder. I nærværende metode er vækshastighed og udbytte responsvariabler, der er afledt af målevariabler som bladantal, bladareal, frisk vægt eller tør vægt.

**Semistatisk test (udskiftningstest)**: en test, hvor testopløsningen udskiftes med bestemte intervaller i løbet af testen.

**Statisk test**: en testmetode, hvor testopløsningen ikke udskiftes under testen.

▼M1

**Endepunkt for en test**: den generelle faktor, som teststoffet fremkalder en ændring af i forhold til kontrollen som mål for testen. I denne testmetode er endepunktet vækshæmning, som kan udtrykkes ved forskellige responsvariabler, der er baseret på en eller flere målevariabler.

**Testsubstrat**: det komplette, syntetiske næringssubstrat, hvorpå testplanterne vokser, når de eksponeres for teststoffet. Normalt er teststoffet opløst i testsubstratet.

**Udbytte**: værdien af en målevariabel for biomasse ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af samme variabel ved eksponeringsperiodens start.

1.3. TESTENS PRINCIP

Eksponentielt voksende plantekulturer af slægten *Lemna* dyrkes som monokultur ved forskellige koncentrationer af teststoffet i syv dage. Testens formål er at kvantificere stofrelaterede virkninger på den vegetative vækst i dette tidsrum, baseret på vurdering af udvalgte målevariabler. Bladantallet er den primære målevariabel. Der måles desuden mindst én anden målevariabel, (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt), da nogle stoffer kan påvirke andre målevariabler langt mere end bladantallet. De stofrelaterede virkninger kvantificeres ved, at væksten i testopløsningerne sammenholdes med væksten i kontrolprøverne, hvorudfra man bestemmer den koncentration, som frembringer en bestemt hæmning x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og som betegnes $EC_x$ (f.eks. $EC_{50}$).

Testens endepunkt er hæmning af væksten, der er udtrykt som den logaritmiske stigning i målevariablen (den gennemsnitlige specifikke vækshastighed) i eksponeringsperioden. Ud fra de gennemsnitlige specifikke vækshastigheder, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning x % (f.eks. 50 %) af vækshastigheden, og denne betegnes $E_rC_x$ (f.eks. $E_rC_{50}$).

I denne metode anvendes udbytte som en supplerende responsvariabel, der kan være nødvendig for at efterkomme myndighedsbestemmelserne i visse stater. Udbyttet defineres som værdien af målevariablerne ved eksponeringsperiodens slutning minus værdien af variablerne ved eksponeringsperiodens start. Ud fra det udbytte, der er registreret i en række testopløsninger, bestemmes den koncentration, der frembringer en bestemt hæmning x % (f.eks. 50 %) af udbyttet, og denne betegnes $E_yC_x$ (f.eks. $E_yC_{50}$).

Derudover kan den laveste koncentration med observeret effekt (LOEC) og nuleffekt-koncentrationen (NOEC) bestemmes statistisk.

1.4. OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

Der skal foreligge en tilstrækkeligt følsom analysemetode til kvantitativ bestemmelse af stoffet i testsubstratet.

▼M1

Af oplysninger om teststoffet, der kan være nyttige ved fastsættelse af testbetingelserne, kan nævnes strukturformel, renhed, vandopløselighed, stabilitet i vand, lysstabilitet, $pK_a$, $K_{ow}$, damptryk og bionedbrydelighed. Vandopløseligheden og damptrykket kan bruges til at beregne Henrys konstant, som angiver, om der kan forventes væsentligt tab af teststof i løbet af testperioden. Derved fås en indikation af, om der skal træffes særlige skridt til at kontrollere sådanne tab. Er oplysningerne om teststoffets opløselighed og stabilitet usikre, anbefales det at vurdere disse ved testbetingelserne, dvs. med samme næringssubstrat, temperatur og belysning som i testen.

Når regulering af testsubstratets pH er særlig vigtig, f.eks. ved testning af metaller eller hydrolytisk ustabile stoffer, anbefales det at tilsætte en buffer til næringssubstratet (se første afsnit i punkt 1.7.4). I (11) er der givet vejledning for testning af stoffer, hvis fysisk-kemisk egenskaber vanskeliggør testning.

1.5. REFERENCESTOF

Til kontrol af testmetoden kan der testes et eller flere referencestoffer, f.eks. 3,5-dichlorphenol, som er anvendt i den internationale ringtest (10). Det tilrådes, at testning af et referencestof finder sted mindst to gange årligt eller, hvis testningsfrekvensen er lavere, sideløbende med toksicitetsbestemmelsen af et teststof.

1.6. TESTENS VALIDITET

For at testen skal være valid, skal fordoblingstiden for bladantallet i kontrollen være mindre end 2,5 dage (60 h), tilnærmelsesvis svarende til en syvdobling på syv dage og en gennemsnitlig specifik væksthastighed på 0,275 $d^{-1}$. Med de testsubstrater og testbetingelser, der er beskrevet i denne testmetode, kan dette kriterium opfyldes ved at gennemføre testen under statiske betingelser (8). Kriteriet forventes desuden at kunne opfyldes under semistatiske forhold og med gennemstrømning. Beregningen af fordoblingstiden er vist i punkt 2.1.

1.7. BESKRIVELSE AF METODEN

1.7.1. **Apparatur**

Alt udstyr, der kommer i berøring med testsubstraterne, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale. Glasapparatur, der anvendes til dyrkning og testning, skal være renset for kemiske kontaminanter, der kan udvaskes i testsubstratet, og skal være sterilt. Testbeholderne skal være tilstrækkeligt vide til, at blade fra forskellige kolonier i kontrolbeholderne kan vokse uden at overlappe hinanden ved testens slutning. Rødderne må gerne røre bunden af testbeholderen, men en mindste dybde på 20 mm og et mindste rumfang på 100 ml i hver testbeholder tilrådes. Valget af testbeholder er ikke afgørende, når blot disse krav er opfyldt. Bægerglas, krystallisationsskåle eller petriskåle af glas med passende mål har alle vist sig velegnede. Testbeholderne skal have låg, der nedsætter fordampning og utilsigtet kontaminering til et minimum og samtidig tillader det nødvendige luftskifte. Testbeholderne, og især disses låg, må ikke skygge eller ændre lysets spektrale sammensætning.

▼M1

Kulturerne og testbeholderne må ikke opbevares sammen. Dette opnås bedst ved, at klimakamre, inkubatorer eller lokaler er separate. Belysning og temperatur skal kunne reguleres og holdes på et konstant niveau (se punkt 1.7.8).

1.7.2. **Testorganisme**

Som testorganisme anvendes i denne test enten *Lemna gibba* eller *Lemna minor*. Tillæg 1 indeholder en kort beskrivelse af de arter af andemad, der er blevet anvendt til toksicitetstestning. Plantemateriale kan fås fra en kultursamling, fra et andet laboratorium eller i felten. Er planterne indsamlet i felten, skal de opbevares i mindst otte uger i kultur i samme substrat, som benyttes til testningen, før de anvendes. Indsamlingssteder for startkulturer i felten skal være fri for åbenbare forureningskilder. Hvis de leveres fra et andet laboratorium eller fra en kultursamling, skal de opbevares på tilsvarende måde i mindst tre uger. Kilden til plantematerialet og den testede art og klon (hvis denne kendes) skal altid rapporteres.

Der skal anvendes monokulturer, som er fri for synlig kontaminering med andre organismer såsom alger og protozoer. Sunde planter af *L. minor* består af kolonier på mellem to og fem blade, mens sunde kolonier af *L. gibba* kan bestå af op til syv blade.

De testede planters kvalitet og ensartethed har stor indflydelse på testresultatet, hvorfor de bør udvælges nøje. Der skal anvendes unge, hurtigtvoksende planter uden synlige forandringer eller misfarvning (chlorose). Kulturer af god kvalitet er kendetegnet af en høj andel af kolonier med mindst to blade. Et stort antal enkeltblade er tegn på miljøbelastning som f.eks. begrænset adgang til næringsstoffer, og plantemateriale fra sådanne kulturer bør ikke anvendes til testning.

1.7.3. **Dyrkning**

For at undgå at skulle vedligeholde kulturerne så ofte (f.eks. når *Lemna*-test ikke påtænkes anvendt i en periode) kan kulturerne opbevares ved reduceret belysning og temperatur (4-10 °C). En nærmere beskrivelse af dyrkningen er givet i tillæg 2. Hvis der er tydelige tegn på kontaminering med alger eller andre organismer, udtages en delprøve af *Lemna*-blade, som overfladesteriliseres og derefter overføres til friskt substrat (se tillæg 2). I så fald kasseres resten af den kontaminerede kultur.

Mindst syv dage før testning overføres et tilstrækkeligt antal kolonier aseptisk til friskt, sterilt substrat og dyrkes i 7-10 dage under testbetingelserne.

1.7.4. **Testsubstrat**

Der anbefales forskellige substrater til *Lemna minor* og *Lemna gibba* som beskrevet nedenfor. Det må nøje overvejes, om der skal anvendes pH-buffer i testsubstratet (MOPS (4-morpholinpropan sulfonsyre, CAS-nr.: 1132-61-2, Einecs-nr.: 214-478-5) i *L. minor*-substrat og $NaHCO_3$ i *L. gibba*-substrat), hvis det mistænkes for at kunne reagere med teststoffet og påvirke tegnene på dets toksicitet. Steinberg-substrat (12) er ligeledes acceptabelt, når blot validitetskriterierne er opfyldt.

▼M1

Til dyrkning af og testning med *L. minor* anbefales en modificeret version af *Lemna*-næringssubstratet efter svensk standard (SIS). Sammensætningen af dette substrat er givet i tillæg 3.

Til dyrkning af og testning med *L. gibba* anbefales næringssubstratet 20X AAP, som er beskrevet i tillæg 3.

Steinberg-substratet, som beskrives i tillæg 3, er også velegnet til *L. minor* og kan desuden bruges til *L. gibba*, når blot validitetskriterierne er opfyldt.

1.7.5. **Testopløsninger**

Testopløsninger fremstilles sædvanligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsningerne af teststoffet fremstilles normalt ved opløsning af stoffet i næringssubstrat.

Den højeste testede koncentration af teststoffet skal sædvanligvis ikke være større end stoffets vandopløselighed under testbetingelserne. Det skal dog bemærkes, at *Lemna* spp. flyder ovenpå og kan blive eksponeret for stoffer, som samler sig i vand-luft-grænsefladen (f.eks. stoffer, der er tungtopløselige i vand, hydrofobe eller overfladeaktive). Under sådanne omstændigheder vil eksponeringen skyldes andet materiale end det opløste materiale, og alt efter teststoffets egenskaber kan testkoncentrationerne være større end opløseligheden i vand. For teststoffer med lav vandopløselighed kan det være nødvendigt at fremstille en koncentreret stamopløsning eller -dispersion af stoffet ved hjælp af et organisk opløsnings- eller dispergeringsmiddel for at lette tilsætning af nøjagtige mængder teststof til testsubstratet og medvirke til, at det dispergeres eller opløses. Brug af sådanne midler bør på enhver måde søges undgået. Brug af sådanne hjælpeopløsnings- og dispergeringsmidler må ikke medføre fytotoksisk virkning. Som eksempler på almindeligt anvendte opløsningsmidler, der er uden fytotoksisk virkning i koncentrationer op til 100 $\mu l \cdot l^{-1}$, kan nævnes acetone og dimethylformamid. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal dets slutkoncentration rapporteres og skal holdes så lav som muligt ($\leq$ 100 $\mu l \cdot l^{-1}$), og der skal være samme koncentration af opløsnings- eller dispergeringsmiddel i alle behandlings- og kontrolgrupper. Nærmere anvisninger kan findes i (11).

1.7.6. **Behandlings- og kontrolgrupper**

Det vil lette valget af passende teststofkoncentrationer, hvis man på forhånd kender til teststoffets toksicitet over for *Lemna*, f.eks. fra et indledende forsøg. I den endelige toksicitetstest skal der normalt være mindst fem teststofkoncentrationer, der danner en geometrisk række. Kvotienten mellem testkoncentrationerne skal helst ikke være over 3,2, men kan dog være større, når koncentrations-responskurven er flad. Anvendes færre end fem koncentrationer, skal dette begrundes. Der skal anvendes mindst tre replikater for hver testkoncentration.

Ved fastsættelse af området for testkoncentrationerne (i det indledende forsøg og/eller i den endelige toksicitetstest) skal følgende tages i betragtning:

▼M1

— Ved bestemmelse af en $EC_x$-værdi skal denne ligge i det område, testkoncentrationerne dækker, for at den skal blive bestemt med et tilstrækkeligt konfidensniveau. Ved beregning af en $EC_{50}$-værdi skal den højeste testkoncentration således være større end $EC_{50}$-værdien. Ligger $EC_{50}$-værdien uden for testkoncentrationernes område, bliver de tilhørende konfidensintervaller store, så det kan blive umuligt at foretage en pålidelig vurdering af modellens statistiske fit.

— Hvis målet er at bestemme en LOEC/NOEC-værdi, skal den laveste testkoncentration være så lav, at væksten ikke er væsentligt lavere end i kontrolprøven. Desuden skal den højeste testkoncentration være så høj, at væksten er væsentligt mindre end i kontrolprøven. Er det ikke tilfældet, må testen gentages med et andet koncentrationsområde (medmindre den højeste koncentration svarer til opløselighedsgrænsen eller til den maksimalt krævede grænsekoncentration, f.eks. 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Hver test skal omfatte kontroller med samme næringssubstrat, samme antal blade og kolonier og samme miljøbetingelser og procedurer som testbeholderne, men uden teststof. Hvis der anvendes et opløsnings- eller dispergeringsmiddel, skal der indgå en ekstra kontrolbehandling med samme koncentration af opløsnings/-dispergeringsmiddel som i testbeholderne med teststof. Antallet af replikate kontrolprøver (og, i givet fald, prøver med opløsningsmiddel) skal mindst være lig antallet af beholdere for hver testkoncentration, og ideelt skal der være dobbelt så mange.

Hvis der ikke kræves bestemmelse af NOEC, kan testens design ændres, så der er flere forskellige koncentrationer og færre replikater for hver koncentration. Der skal dog være mindst tre replikater af kontrolprøverne.

1.7.7. **Eksponering**

Kolonier bestående af 2 til 4 synlige blade overføres fra podekulturen i tilfældig orden til testbeholderne under aseptiske betingelser. Hver testbeholder skal indeholde i alt 9 til 12 blade. Der skal være samme antal blade og kolonier i hver testbeholder. Erfaringerne med brugen af metoden og oplysninger fra ringtest har vist, at tre replikater pr. behandling med 9 til 12 blade som startværdi i hver replikat er tilstrækkeligt til at påvise vækstforskelle mellem behandlingerne svarende til en hæmning på 4 til 7 %, beregnet som væksthastighed (10 til 15 %, beregnet som udbytte) (10).

Testbeholdernes placering i inkubatoren skal være randomiseret for at minimere indflydelsen af rumlige forskelle i lysintensitet eller temperatur. Desuden skal testen enten have blokdesign, eller også skal testbeholderne omplaceres tilfældigt ved hver observation (eller hyppigere).

▼M1

Hvis en indledende stabilitetstest viser, at teststofkoncentrationen ikke kan opretholdes (dvs. den målte koncentration kommer ned under 80 % af den målte initialkoncentration) gennem hele testperioden (7 dage), anbefales et semistatisk testregime. Dette gennemføres ved, at kolonierne eksponeres for friskfremstillede test- og kontroloplø sninger mindst to gange i løbet af testen (f.eks. på dag 3 og 5). Hyppigheden af eksponeringen for friskt substrat afhænger af teststoffets stabilitet. Meget ustabile eller flygtige stoffer kan kræve hyppigere eksponering, for at koncentrationerne kan holdes tilnærmelsesvis konstante. I visse tilfælde kan det være nødvendigt at bruge en gennemstrømningsmetode (11)(13).

Eksponeringsscenariet ved påføring på bladene (spray) er ikke omhandlet i denne metode. Der henvises i stedet til (14).

1.7.8. **Inkubationsbetingelser**

Belysningen skal være konstant og komme fra lysstofrør med »warm« eller »cool white« lys med en styrke, der vælges i området 85-135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, målt i det fotosyntetisk aktive spektrum (400-700 nm) i punkter med samme afstand fra lyskilden som bladene af *Lemna* (svarende til 6 500-10 000 lux). Lysstyrken over testområdet må ikke afvige mere end ± 15 % fra den valgte lysstyrke. Den anvendte metode til lysdetektion og -måling, specielt den anvendte type sensor, vil påvirke måleværdien. Sfæriske sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over og under måleplanet) og cosinus-sensorer (som reagerer på lys fra alle vinkler over måleplanet) må foretrækkes frem for retningsbestemte sensorer og vil give højere aflæsninger fra en lyskilde bestående af mange punkter som den her beskrevne.

Temperaturen i testbeholderne skal være 24 ± 2 °C. Kontrolsubstratets pH må højst stige med 1,5 enheder under testen. Dog vil en afvigelse på mere end 1,5 enhed ikke gøre testen ugyldig, når det kan vises, at validitetskriterierne er opfyldt. I særlige tilfælde, f.eks. testning af ustabile stoffer eller metaller, må der udvises ekstra opmærksomhed over for pH-afvigelse. Nærmere vejledning er givet i (11).

1.7.9. **Varighed**

Testen afsluttes 7 dage efter, at planterne er overført til testbeholderne.

1.7.10. **Målinger og analytiske bestemmelser**

Ved testens begyndelse tælles og registreres antallet af blade i testkarrene, idet der sørges for, at fremstående, klart synlige blade medtages. Antal blade med normalt og unormalt udseende bestemmes ved testens begyndelse, mindst hvert tredje døgn i løbet af eksponeringsperioden (dvs. mindst to gange i løbet af testperioden på syv dage) samt ved testens slutning. Ændringer i planternes udvikling, f.eks. i bladstørrelse, udseende, tegn på nekrose, chlorose eller opsvulmethed, opbrydning af kolonierne eller tab af disses flydeevne, samt i rødderne s længde og udseende, skal registreres. Særlige kendetegn ved testsubstratet (f.eks. ikke-opløst materiale i testbeholderen eller algevækst på denne) skal ligeledes registreres.

▼**M1**

Foruden at bladantallet registreres under testen, vurderes teststoffets virkninger på en (eller flere) af følgende målevariabler:

i) totalt bladareal

ii) tør vægt

iii) frisk vægt.

Bestemmelse af det totale bladareal har den fordel, at det kan bestemmes for hver testbeholder og kontrolbeholder både ved testens start, under testen og ved dens slutning. Den tørre og friske vægt bestemmes ved testens start på en prøve af podekulturen, der er repræsentativ for den, der anvendes til at begynde testen, samt ved testens slutning med plantemateriale fra hver test- og kontrolbeholder. Hvis der ikke måles bladareal, er tør vægt at foretrække frem for frisk vægt.

Bestemmelse af totalt bladareal, tør vægt og frisk vægt kan foretages således:

i) Totalt bladareal: Det totale bladareal af alle kolonier kan bestemmes ved billedanalyse: Der kan afbildes en silhuet af testbeholder og planter med et videokamera (idet beholderen anbringes på en lyskasse), og det resulterende billede digitaliseres. Derefter kan det totale bladareal i testbeholderen bestemmes ved kalibrering med flade former med kendt areal. Der skal sørges for at udelukke interferens fra testbeholderens rand. En alternativ, men mere omstændelig metode er at fotokopiere testbeholdere og planter, klippe den resulterende silhuet af kolonierne ud og bestemme arealet med en bladareal-analysator eller ved hjælp af millimeterpapir. Også andre teknikker kan anvendes (f.eks. vejning af papiret svarende til silhuetten og sammenholdelse med et enhedsareal).

ii) Tør vægt: Alle kolonier indsamles fra hver testbeholder og skylles med destilleret eller deioniseret vand. De duppes fri for overskydende vand og tørres derefter ved 60 °C, til vægten er konstant. Eventuelle rodstumper skal medtages. Den tørre vægt skal angives med en nøjagtighed mindst svarende til 0,1 mg.

iii) Frisk vægt: Alle kolonier overføres til på forhånd vejede rør af polystyren (eller andet inert materiale), hvis afrundede bund er forsynet med et lille hul (1 mm). Rørene centrifugeres derefter ved 3 000 o./min. i 10 minutter ved rumtemperatur. Rørene, der indeholder de nu tørrede kolonier, vejes igen, og den friske vægt beregnes ved fratrækning af vægten af de tomme rør.

1.7.10.1. *Hyppighed af målinger og analytiske bestemmelser*

Hvis testen udføres statisk, skal pH for hver behandling måles ved testens start og slutning. Udføres testen semistatisk, foretages pH-måling på hver portion »frisk« testopløsning før hver udskiftning foruden på de tilsvarende »brugte« opløsninger.

▼M1

Lysintensiteten skal måles i vækstkammeret, inkubatoren eller lokalet i punkter med samme afstand til lyskilden som bladene af *Lemna*. Målingerne foretages mindst én gang i løbet af testen. Mindst én gang dagligt måles temperaturen af substratet i en surrogatbeholder, der opbevares ved samme betingelser i klimakammeret, inkubatoren eller lokalet.

Under testen bestemmes teststofkoncentrationerne med passende intervaller. Mindstekravet i statiske test er bestemmelse af koncentrationerne ved testens start og slutning.

I semistatiske test, hvor teststofkoncentrationen ikke forventes at forblive inden for ± 20 % af den nominelle koncentration, er det nødvendigt at analysere alle frisk fremstillede testopløsninger, og de samme opløsninger analyseres ved hver udskiftning (se tredje afsnit i punkt 1.7.7). For de test, hvor den målte startkoncentration af teststoffet ikke er inden for ± 20 % af den nominelle værdi, men hvor der kan fremlægges tilstrækkelig dokumentation for, at startkoncentrationerne er repeterbare og stabile (dvs. inden for området 80-120 % af startkoncentrationen), kan det godtages, at der kun foretages kemisk bestemmelse af den højeste og laveste testkoncentration. I alle tilfælde behøver teststofkoncentrationen før udskiftning kun bestemmes på én replikat testbeholder ved hver testkoncentration (eller på indholdet af de poolede beholdere for hver replikat).

For gennemstrømningstest vil det være hensigtsmæssigt med en prøvetagningsplan svarende til den, der er beskrevet for semistatiske test, herunder analyse ved testens start, midtpunkt og slutning, men måling af »brugt« testopløsning er ikke hensigtsmæssig i dette tilfælde. I sådanne test skal flowhastigheden af fortyndingsmiddel og teststofopløsning eller teststof-stamopløsning kontrolleres dagligt.

Hvis det kan konstateres, at prøvestofkoncentrationen har været holdt tilfredsstillende inden for ± 20 % af den nominelle eller målte startkoncentration under hele testen, kan analysen af resultaterne baseres på nominelle eller målte startværdier. Er afvigelsen fra den nominelle eller målte startkoncentration større end ± 20 %, skal analysen af resultaterne baseres på den geometriske middelkoncentration under eksponeringen eller på modeller, der beskriver faldet i teststofkoncentrationen (11).

1.7.11. **Grænsetest**

Under visse omstændigheder, f.eks. når en indledende test viser, at teststoffet er uden toksiske virkninger i koncentrationer på op til 100 $mg \cdot l^{-1}$, dog ikke over stoffets opløselighed i testsubstratet, kan der udføres en grænsetest, hvor reaktionen i en kontrolgruppe sammenholdes med reaktionen i én behandlingsgruppe (100 $mg \cdot l^{-1}$ eller en koncentration lig med opløselighedsgrænsen). Det anbefales kraftigt, at dette understøttes ved analyse af eksponeringskoncentrationen. Alle de beskrevne testbetingelser og validitetskriterier finder anvendelse på en grænsetest bortset fra, at antallet af behandlingsreplikater skal fordobles. Væksten i kontrol- og behandlingsgruppen kan analyseres med en statistisk test til sammenligning af middelværdier, f.eks. Students t-test.

▼M1

2. **DATA OG RAPPORTERING**

2.1. FORDOBLINGSTID

Til bestemmelse af fordoblingstiden ($T_d$) for bladantallet og forsøgets overensstemmelse med dette validitetskriterium (punkt 1.6) anvendes følgende formel på de data, der er indsamlet for kontrolbeholderne:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

hvor $\mu$ er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, der bestemmes som beskrevet i første og andet afsnit i punkt 2.2.1.

2.2. RESPONSVARIABLER

Testens formål er at bestemme teststoffets virkninger på den vegetative vækst af *Lemna*. I nærværende testmetode beskrives to responsvariabler, da præferencer og myndighedskrav er forskellige i medlemsstaterne. For at testresultaterne skal kunne godtages i alle medlemsstater, skal virkningerne vurderes ved hjælp af begge de nedenfor beskrevne responsvariabler a) og b).

a) Gennemsnitlig specifik væksthastighed: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af den logaritmiske ændring i bladantallet samt den logaritmiske ændring i en anden måleparameter (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt) med tiden (udtrykt pr. dag) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe. Den kaldes undertiden relativ væksthastighed (15).

b) Udbytte: Denne responsvariabel beregnes på grundlag af ændringen i bladantallet og desuden ændringen i en anden måleparameter (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt) i kontrollerne og i hver behandlingsgruppe indtil testens slutning.

Det skal bemærkes, at toksicitetsværdier beregnet ved hjælp af disse to responsvariabler ikke er sammenlignelige, og at forskellen mellem dem må holdes for øje ved anvendelse af testens resultater. $EC_x$-værdier baseret på gennemsnitlig specifik væksthastighed ($E_rC_x$) vil sædvanligvis være højere end resultater baseret på udbytte ($E_yC_x$), når testbetingelserne i denne metode er overholdt, hvilket følger af det matematiske grundlag for de to beregningsmåder. Dette må ikke opfattes som en forskel i følsomhed mellem de to responsvariabler, men kun, at der er tale om to matematisk forskellige størrelser. Begrebet gennemsnitlig specifik væksthastighed bygger på det generelle eksponentielle vækstmønster for andemad i ikke-begrænsede kulturer, idet toksiciteten vurderes på grundlag af virkningerne på væksthastigheden og ikke afhænger af den absolutte størrelse af den specifikke væksthastighed af kontrollen, koncentrations-responskurvens hældning eller testens varighed. Resultater, der er baseret på responsvariablen udbytte, afhænger derimod af alle disse øvrige variabler. $E_yC_x$ afhænger af den specifikke væksthastighed af de arter af andemad, der anvendes i hver test, og af den maksimale specifikke væksthastighed, som kan variere mellem de forskellige arter og endda kloner. Denne responsvariabel bør ikke anvendes til at sammenligne følsomheden over for giftstoffer mellem forskellige arter af andemad, endsige forskellige kloner. Skønt det videnskabeligt foretrukne grundlag til vurdering af toksicitet er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed, indeholder nærværende testmetode også toksicitetsvurderinger baseret på udbytte for at imødekomme de aktuelle myndighedskrav i visse stater.

▼M1

Beregningen af toksicitet skal baseres på bladantal og på mindst én anden målevariabel (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt), da visse stoffer kan påvirke andre målevariabler langt mere end bladantallet. Denne virkning ville ikke blive opdaget ved beregning af bladantallet alene.

Bladantallet og eventuelle andre registrerede målevariabler, dvs. totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt, samles i en tabel sammen med teststofkoncentrationerne for hvert målepunkt. Den efterfølgende dataanalyse, f.eks. beregning af estimater for LOEC, NOEC eller $EC_x$, skal baseres på værdierne for de enkelte replikater og ikke beregnede gennemsnit for hver behandlingsgruppe.

2.2.1. **Gennemsnitlig specifik væksthastighed**

Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed for en given periode beregnes som den logaritmiske stigning i vækstvariablerne — bladantal og en anden målevariabel (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt) — ved hjælp af nedenstående udtryk for hver replikat af kontrol og behandlingsprøve:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}\ , (\text{dag}^{-1})$$

hvor:

— $\mu_{i-j}$: er den gennemsnitlige specifikke væksthastighed i tidsrummet fra i til j

— $N_i$: er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden i

— $N_j$: er værdien af målevariablen i test- eller kontrolbeholderen til tiden j

— t: er tidsrummet fra i til j

For hver behandlings- og kontrolgruppe beregnes en gennemsnitlig væksthastighed samt estimater for variansen.

Den gennemsnitlige specifikke væksthastighed skal beregnes for hele testperioden (tiden »i« i ovenstående formel er testens starttid, og tiden »j« er testens sluttid). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af den specifikke væksthastighed samt estimater for variansen. Derudover foretages en trinvis beregning af væksthastigheden for at vurdere teststoffets virkninger i eksponeringsperioden (f.eks. ved betragtning af logaritmisk transformerede vækstkurver). Væsentlige forskelle mellem den trinvist beregnede væksthastighed og den gennemsnitlige væksthastighed tyder på en afvigelse fra konstant eksponentiel vækst, og nøje granskning af vækstkurverne er da nødvendig. I så fald kan et forsigtigt skøn opstilles ved at sammenholde de specifikke væksthastigheder fra behandlede kulturer i det tidsrum, hvor hæmningen er maksimal, med de tilsvarende værdier for kontrolprøver i samme tidsrum.

▼M1

Hæmningen i procent af væksthastigheden ($I_r$) kan derefter beregnes for hver testkoncentration (behandlingsgruppe) af følgende udtryk:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

hvor:

— % $I_r$: er hæmningen i procent af den gennemsnitlige specifikke væksthastighed

— $\mu_C$: er gennemsnitsværdien af μ i kontrolgruppen

— $\mu_T$: er gennemsnitsværdien af μ i behandlingsgruppen

2.2.2. **Udbytte**

Virkningerne på udbyttet bestemmes på grundlag af to målevariabler, bladantallet og en anden målevariabel (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt) i hver testbeholder ved testens start og slutning. For tør vægt og frisk vægt bestemmes start-biomassen på grundlag af en prøve af blade, der tages fra samme batch som den, der er anvendt til at pode testbeholderne (se andet afsnit i punkt 1.7.3). For hver testkoncentration og kontrol beregnes en gennemsnitsværdi af udbyttet samt estimater for variansen. Udbyttehæmningen i procent (% $I_y$) kan beregnes for hver behandlingsgruppe som følger:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

hvor:

— % $I_y$: er udbyttereduktionen i procent

— $b_C$: er slut-biomasse minus start-biomasse for kontrolgruppen

— $b_T$: er slut-biomasse minus start-biomasse for behandlingsgruppen

2.2.3. **Optegning af koncentrations-responskurver**

Der afsættes koncentrations-responskurver over sammenhængen mellem den gennemsnitlige hæmningsprocent for responsvariablerne ($I_r$ eller $I_y$, beregnet som vist i sidste afsnit i punkt 2.2.1 eller i punkt 2.2.2) og logaritmen til teststofkoncentrationen.

2.2.4. **Beregning af $EC_x$**

Estimaterne for $EC_x$ (f.eks. $EC_{50}$) baseres på gennemsnitsværdien dels af specifik væksthastighed ($E_rC_x$), dels af udbytte ($E_yC_x$), der hver især er baseret på bladantal og endnu en målevariabel (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt). Dette skyldes, at der findes teststoffer med forskellig virkning på bladantallet og på de øvrige målevariabler. Som parametre for toksicitet er der derfor fire $EC_x$-værdier for hvert beregnet hæmningsniveau x: $E_rC_x$ (bladantal), $E_rC_x$ (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt), $E_yC_x$ (bladantal) og $E_yC_x$ (totalt bladareal, tør vægt eller frisk vægt).

▼**M1**

2.3. STATISTISKE METODER

Målet er at formulere den kvantitative koncentrations-responssammenhæng ved hjælp af regressionsanalyse. Der kan anvendes vægtet lineær regression efter forudgående lineariserende transformation af responsdataene — til f.eks. probit-, logit- eller Weibull-enheder (16), men det må foretrækkes at benytte ikke-lineære regressionsmetoder, da de bedre håndterer de uundgåelige uregelmæssigheder i data og afvigelser fra jævne fordelinger. I området tæt på enten ingen hæmning eller total hæmning kan sådanne uregelmæssigheder blive forstørret ved transformation og derved gribe forstyrrende ind i analysen (16). Det må bemærkes, at standardanalysemetoder, hvor der bruges probit-, logit- eller Weibull-transformerede variabler, er bestemt til brug på binære data (f.eks. død eller overlevelse) og må modificeres for at kunne benyttes til data for væksthastighed eller udbytte. Særlige metoder til bestemmelse af $EC_x$-værdier ud fra kontinuerte data findes i henvisning (17)(18) og (19).

For hver responsvariabel, der skal analyseres, anvendes koncentrations-responsrelationen til at beregne punktestimater for $EC_x$-værdier. Når det er muligt, skal der bestemmes 95 % konfidensgrænser for hvert estimat. Responsdataenes tilpasningsgrad til regressionsmodellen vurderes enten grafisk eller statistisk. Regressionsanalysen skal foretages på responsværdierne for de enkelte replikater, ikke på gruppegennemsnit.

Hvis de tilgængelige regressionsmodeller eller -metoder er uegnede til dataene, kan estimater og konfidensgrænser for $EC_{50}$ desuden fås ved lineær interpolation med bootstrapping (20).

Til beregning af et estimat for LOEC og dermed NOEC må middelværdierne for behandlingerne sammenholdes ved hjælp af variansanalyse. Gennemsnittet for hver koncentration sammenholdes derefter med gennemsnittet for kontrollerne ved hjælp af en egnet multisammenlignings- eller trend test-metode. Dunnetts eller Williams' test kan være nyttig (21)(22)(23)(24). Det må vurderes, om variansanalysens forudsætning om varianshomogenitet er opfyldt. Denne vurdering kan foretages grafisk eller ved en formel test (25). Hertil kan Levenes eller Bartletts test anvendes. Manglende opfyldelse af forudsætningen om varianshomogenitet kan undertiden afhjælpes ved logaritmisk transformation af dataene. Hvis variansen er ekstremt heterogen og ikke kan korrigeres ved transformation, må analyse med step-down Jonkheere trend test overvejes. Supplerende vejledning for bestemmelse af NOEC er givet i (19).

Den senere tids videnskabelige udvikling har ført til en anbefaling om, at NOEC-begrebet afskaffes og erstattes med regressionsbaserede punktestimater $EC_x$. Der er ikke fastlagt en passende værdi af x til denne *Lemna*-test. Et område på 10 til 20 % synes imidlertid at være passende (afhængigt af den valgte responsvariabel), og det må foretrækkes at rapportere både $EC_{10}$ og $EC_{20}$.

3. **RAPPORTERING**

3.1. TESTRAPPORT

Testrapporten skal indeholde følgende:

Teststoffet:

— fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, herunder vandopløselighed

▼**M1**

— kemiske identifikationsdata (f.eks. CAS-nr.), herunder renhed.

Testede arter:

— videnskabeligt navn, klon (hvis den kendes) og kilde.

Testbetingelser:

— den anvendte testmetode (statisk, semistatisk eller gennemstrømningstest)

— startdato og varighed for testen

— testssubstrat

— beskrivelse af testens design: testbeholdere og låg, opløsningsvolumener, antal kolonier og blade pr. testbeholder ved testens start

— testkoncentrationer (nominelle eller målte) og antal replikater for hver koncentration

— metoder til fremstilling af stam- og testopløsninger, herunder eventuelle opløsnings- og dispergeringsmidler

— testtemperaturen

— lyskilde, lysintensitet og -homogenitet

— pH-værdierne af test- og kontrolsubstraterne

— teststofkoncentrationer og analysemetoder med fyldestgørende oplysninger om kvalitetsvurdering (valideringsundersøgelser, standardafvigelser eller konfidensgrænser for analyserne)

— metoder til bestemmelse af bladantal og andre målevariabler, f.eks. tør vægt, frisk vægt og bladareal

— alle fravigelser af nærværende testmetode.

Resultater:

— rådata: antal blade og andre målevariabler i hver test- og kontrolbeholder ved hver observation og hver analyse

— gennemsnit og standardafvigelse for hver målevariabel

— vækstkurver for hver koncentration (brug af logaritmisk transformerede målevariabler anbefales, se andet afsnit i punkt 2.2.1)

— fordoblingstid/vækshastighed i kontrolprøven, baseret på bladantal

— beregnede responsvariabler for hver behandlingsreplikat, med gennemsnitsværdier og variationskoefficient for replikaterne

— grafisk fremstilling af sammenhængen mellem koncentration og virkning

— estimater for toksicitetsendepunkter for responsvariablerne, f.eks. $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$, med tilhørende konfidensintervaller; LOEC og/eller NOEC (hvis disse er beregnet) og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

▼M1

— hvis variansanalyse er anvendt, størrelsen af den virkning, det er muligt at påvise (f.eks. mindste signifikante forskel)

— enhver vækststimulation, der er fundet ved nogen behandling

— ethvert visuelt tegn på fytotoksicitet samt observationer af testopløsningerne

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra nærværende testmetode.

4. **LITTERATUR**

(1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.

(2) Der redegøres nærmere for brugen af *Lemna*-undersøgelser for farvede stoffer i afsnit 13.5.3 i EU's Manual of Decisions fra juli 2006, se: http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment — Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, available at

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1234958685#A

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA — United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«. EPA 712-C-96-156. 8pp.

(6) AFNOR — Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

(7) SSI — Swedish Standards Institute. (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (på svensk).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37-120 pp.

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality — Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353-359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481-483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713-718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157-167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485-1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93-96.

▼M1

*Tillæg 1*

**Beskrivelse af Lemna spp.**

Vandplanten med trivialnavnet andemad, *Lemna* spp., tilhører familien *Lemnaceae*, der omfatter en række arter, som er udbredt over hele verden og består af fire slægter. Deres respektive udseende og taksonomi er beskrevet udtømmende (1)(2). *Lemna gibba* og *L. minor* er repræsentative arter fra tempererede områder og finder almindelig anvendelse i toksicitetstest. Begge arter har flydende eller nedsænket skiveformet stilk (blad) og en meget tynd rod, der udgår fra midten af undersiden på hvert blad. *Lemna* spp. danner sjældent blomster, og planterne formerer sig vegetativt ved at skyde nye blade (3). De unge planter er blegere og har kortere rødder end de ældre planter og består af to-tre blade af forskellig størrelse. *Lemnas* enkle struktur, ukønnede formering og korte generationstid gør planten meget velegnet til laboratorietest (4)(5).

På grund af artsbetingede forskelle i følsomhed er sammenligning af følsomhed kun gyldig inden for samme art.

**Eksempler på arter af Lemna, der er blevet anvendt til testning: Henvisninger vedrørende de forskellige arter**

*Lemna aequinoctialis*: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

*Lemna major*: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935-941.

*Lemna minor*: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«. EPA 712-C-96-156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (på svensk).

*Lemna gibba*: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998). pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., »Public draft«. EPA 712-C-96-156. 8pp.

*Lemna paucicostata*: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

*Lemna perpusilla*: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

*Lemna trisulca*: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481-483.

▼M1

*Lemna valdiviana*: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

**Kilder til Lemna-arter**

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tlf. +1 4169783641
Fax +1 4169785878
E-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
USA
Tlf. +1 9195157572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 STOCKHOLM
SVERIGE
Tlf. +46 86747240
Fax: +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
TYSKLAND
E-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

**Litteratur**

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M1**

*Tillæg 2*

**Vedligeholdelse af stamkultur**

Ved lavere temperatur (4-10 °C) kan stamkulturer vedligeholdes i længere tid uden at skulle gendannes. Næringssubstratet til *Lemna* kan være det samme som det, der anvendes ved testning, men andre næringsrige substrater kan anvendes til stamkulturer.

Med jævne mellemrum udtages et antal unge, lysegrønne planter og overføres aseptisk til nye dyrkningsbeholdere med friskt substrat. Under de her foreslåede køligere forhold kan dyrkning af subkulturer ske med op til tre måneders mellemrum.

Der skal anvendes kemisk rene (syrevaskede) og sterile dyrkningsbeholdere af glas samt aseptisk håndtering. Hvis en stamkultur bliver kontamineret med. f.eks. alger eller svampe, må der foretages indgreb til at eliminere kontaminanten. For algers og de fleste andre kontaminanters vedkommende kan dette opnås ved overfladesterilisation. Der udtages en prøve af det kontaminerede plantemateriale, og rødderne klippes bort. Materialet omrystes derefter kraftigt med rent vand, efterfulgt af nedsænkning i en 0,5 % (v/v) opløsning af natriumhypochlorit i mellem 30 sekunder og 5 minutter. Plantematerialet skylles derefter med sterilt vand og overføres i et par portioner til dyrkningsbeholdere indeholdende friskt næringssubstrat. Mange af bladene vil dø som følge af denne behandling, specielt hvis der anvendes længere eksponeringsperioder, men nogle af de overlevende vil sædvanligvis være fri for kontaminering. Disse kan derefter bruges til podning af nye kulturer.

▼M1

*Tillæg 3*

**Substrater**

Der anbefales forskellige næringssubstrater til *L. minor* og *L. gibba*. Til *L. minor* anbefales et modificeret substrat efter Swedish Standard (SIS), mens substratet 20X AAP anbefales til *L. gibba*. Nedenfor er sammensætningen af de to substrater angivet. Til fremstilling af sådanne substrater skal anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

***Lemna*-næringssubstrat efter Swedish Standard (SIS)**

— Stamopløsning I-V steriliseres ved autoklavering (120 °C, 15 min.) eller ved membranfiltrering (porediameter ca. 0,2 μm).

— Stamopløsning VI (og valgfrit VII) steriliseres kun ved membranfiltrering og må ikke autoklaveres.

— Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Stamopløsning I-V skal kasseres efter seks måneder, mens holdbarheden for stamopløsning VI (og valgfrit VII) er én måned.

| Stam opløsning nr. | Stof | Koncentration i stamopløsningen ($g \cdot l^{-1}$) | Koncentration i færdigt substrat ($mg \cdot l^{-1}$) | Færdigt substrat | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Grundstof | Koncentration ($mg \cdot l^{-1}$) |
| I | $NaNO_3$ | 8,50 | 85 | Na, N | 32, 14 |
| | $KH_2PO4$ | 1,34 | 13,4 | K, P | 6,0, 2,4 |
| II | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 75 | Mg, S | 7,4, 9,8 |
| III | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 7,2 | 36 | Ca, Cl | 9,8, 17,5 |
| IV | $Na_2CO_3$ | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | $H_3BO_3$ | 1,0 | 1,00 | B | 0,17 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,20 | 0,20 | Mn | 0,056 |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Mo | 0,0040 |
| | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,050 | 0,050 | Zn | 0,011 |
| | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,0050 | 0,0050 | Cu | 0,0013 |
| | $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Co | 0,0020 |
| VI | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,17 | 0,84 | Fe | 0,17 |
| | $Na_2$-EDTA·$2H_2O$ | 0,28 | 1,4 | — | — |
| VII | MOPS (buffer) | 490 | 490 | — | — |

— Til fremstilling af én liter SIS-substrat tilsættes følgende til 900 ml deioniseret vand:

— 10 ml stamopløsning I

— 5 ml stamopløsning II

— 5 ml stamopløsning III

— 5 ml stamopløsning IV

▼M1

— 1 ml stamopløsning V

— 5 ml stamopløsning VI

— 1 ml stamopløsning VII (valgfrit)

*Bemærkning:* Til visse teststoffer kan der yderligere være brug for en stamopløsning VII (MOPS-buffer) (se sidste afsnit i punkt 1.4).

— pH justeres til 6,5 ± 0,2 med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til én liter med deioniseret vand.

**20X AAP-næringssubstrat**

Stamopløsninger fremstilles i sterilt, destilleret eller deioniseret vand.

Sterile stamopløsninger skal opbevares køligt og mørkt. Under disse betingelser vil stamopløsningerne have en holdbarhed på mindst 6-8 uger.

Der fremstilles fem næringssubstrat-stamopløsninger (A1, A2, A3, B og C) til 20X AAP-substrat, idet der anvendes kemikalier af reagenskvalitet. Næringssubstratet fremstilles ved, at der tilsættes 20 ml af hver næringssubstrat-stamopløsning til ca. 850 ml deioniseret vand. pH justeres til 7,5 ± 0,1 med enten 0,1 M eller 1 M HCl eller NaOH, og der fyldes op til én liter med deioniseret vand. Substratet filtreres gennem et membranfilter med en porediameter på ca. 0,2 µm over i en steril beholder.

Det næringssubstrat, der skal bruges til testningen, skal fremstilles 1-2 dage før brug, for at pH kan stabiliseres. Næringssubstratets pH skal kontrolleres før brug og om nødvendigt justeres igen med 0,1 M eller 1 M NaOH eller HCl som beskrevet ovenfor.

| Stamopløsning nr. | Stof | Koncentration i stamopløsningen ($g \cdot l^{-1}$) (*) | Koncentration i færdigt substrat ($mg \cdot l^{-1}$) (*) | Færdigt substrat | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Grundstof | Koncentration ($mg \cdot l^{-1}$) (*) |
| A1 | $NaNO_3$ | 26 | 510 | Na, N | 190, 84 |
| | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 12 | 240 | Mg | 58,08 |
| | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 4,4 | 90 | Ca | 24,04 |
| A2 | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 1,4 | 30 | K, P | 9,4, 3,7 |
| B | $H_3BO_3$ | 0,19 | 3,7 | B | 0,65 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,42 | 8,3 | Mn | 2,3 |
| | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,16 | 3,2 | Fe | 0,66 |
| | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0,30 | 6,0 | — | — |
| | $ZnCl_2$ | 3,3 $mg \cdot l^{-1}$ | 66 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Zn | 31 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,4 $mg \cdot l^{-1}$ | 29 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Co | 7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7,3 $mg \cdot l^{-1}$ | 145 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Mo | 58 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,012 $mg \cdot l^{-1}$ | 0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$ | Cu | 0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$ |
| C | $NaHCO_3$ | 15 | 300 | Na, C | 220, 43 |

(*) Medmindre noteret.

▼M1

Fodnote: Den teoretisk mest passende endelige bicarbonatkoncentration (som vil overflødiggøre nævneværdig pH-justering) er 15 mg/l, ikke 300 mg/l. Den traditionelle brug af 20X AAP-substratet og ringtesten af metoden er imidlertid baseret på 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse og R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

**STEINBERG-substrat (efter ISO 20079)**

*Koncentrationer og stamopløsninger*

— Det modificerede Steinberg-substrat anvendes i ISO 20079 til *Lemna minor* alene (da der deri kun tillades brug af *Lemna minor*), men også med *Lemna gibba* er der opnået gode testresultater.

— Til fremstilling af substratet skal der anvendes kemikalier af reagens- eller analysekvalitet og deioniseret vand.

— Næringssubstratet fremstilles af stamopløsninger eller af det 10-dobbelt koncentrerede substrat, som har den maksimale substratkoncentration uden udfældning.

*Tabel 1*

**pH-stabiliseret STEINBERG-substrat (modificeret efter Altenburger)**

| Stof | | Næringssubstrat | |
|---|---|---|---|
| **Makronæringsstoffer** | molvægt | mg/l | mmol/l |
| $KNO_3$ | 101,12 | 350,00 | 3,46 |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 236,15 | 295,00 | 1,25 |
| $KH_2PO_4$ | 136,09 | 90,00 | 0,66 |
| $K_2HPO_4$ | 174,18 | 12,60 | 0,072 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246,37 | 100,00 | 0,41 |
| **Mikronæringsstoffer** | molvægt | µg/l | µmol/l |
| $H_3BO_3$ | 61,83 | 120,00 | 1,94 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 287,43 | 180,00 | 0,63 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 241,92 | 44,00 | 0,18 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 197,84 | 180,00 | 0,91 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 270,21 | 760,00 | 2,81 |
| EDTA-dinatrium-dihydrat | 372,24 | 1 500,00 | 4,03 |

▼**M1**

*Tabel 2*

**Stamopløsninger (makronæringsstoffer)**

| 1. **Makronæringsstoffer (50 gange koncentreret)** | g/l |
|---|---|
| *Stamopløsning 1:* | |
| $KNO_3$ | 17,50 |
| $KH_2PO_4$ | 4,5 |
| $K_2HPO_4$ | 0,63 |
| *Stamopløsning 2:* | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5,00 |
| *Stamopløsning 3:* | |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 14,75 |

*Tabel 3*

**Stamopløsninger (mikronæringsstoffer)**

| 2. **Mikronæringsstoffer (1 000 gange koncentreret)** | mg/l |
|---|---|
| *Stamopløsning 4:* | |
| $H_3BO_3$ | 120,0 |
| *Stamopløsning 5:* | |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 180,0 |
| *Stamopløsning 6:* | |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 44,0 |
| *Stamopløsning 7:* | |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 180,0 |
| *Stamopløsning 8:* | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 760,00 |
| EDTA-dinatrium-dihydrat | 1 500,00 |

— Stamopløsning 2 og 3 og 4 til 7 kan pooles hver for sig (idet de nødvendige koncentrationer tages i betragtning).

— For at få opnå længere holdbarhed autoklaveres stamopløsningerne ved 121 °C i 20 min., eller sterilfiltreres (0,2 μm) som alternativ. Brug af sterilfiltrering (0,2 μm) tilrådes kraftigt til stamopløsning 8.

**Fremstilling af den endelige koncentration af STEINBERG-substratet (modificeret)**

— Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 900 ml deioniseret vand for at undgå udfældning.

— Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3).

— pH skal være 5,5 ± 0,2 (justeres ved tilsætning af mindst mulig NaOH-opløsning eller HCl).

▼M1

— Der fyldes op med vand til 1 000 ml.

— Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklavering (ved 121 °C i 20 min.).

**Fremstilling af det 10-dobbelt koncentrerede STEINBERG-substrat (modificeret) til midlertidig opbevaring**

— Der tilsættes 20 ml stamopløsning 1, 2 og 3 (se tabel 2) til ca. 30 ml vand for at undgå udfældning.

— Der tilsættes 1,0 ml stamopløsning 4, 5, 6, 7 og 8 (se tabel 3). Der fyldes op med vand til 100 ml.

— Hvis stamopløsningerne er steriliseret, og det anvendte vand er af den korrekte kvalitet, kræves ingen yderligere sterilisering. Hvis steriliseringen finder sted på det endelige substrat, skal stamopløsning 8 tilsættes efter autoklavering (ved 121 °C i 20 min.).

— pH af substratet (i den endelige koncentration) skal være 5,5 ± 0,2.

▼M4

## C.27. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET SEDIMENT

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 218 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen Chironomus sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er baseret på de eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus tentans, der er blevet udviklet i Europa (1) (2) (3) og Nordamerika (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (10) (11).

2. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af sediment med teststoffet. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Scenariet med sedimentspiking har til formål at simulere akkumulerede niveauer af kemikalier i sedimentet. Dette eksponeringssystem omfatter spiking af sediment i et sediment/vand-testsystem.

3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log $K_{ow}$ > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 28-65 dage for C. tentans. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabilt kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.

4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.

5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:

   — udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder

   — testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest

   — anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed.

6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

▼M4

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af testkemikaliet i sediment/vand-systemer. Teststoffet tilsættes sedimentet, og æglarverne overføres derefter til bægerglas, hvor sediment- og vandkoncentrationerne er blevet stabiliseret. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på × % i emergens, larveoverlevelse eller larvevækst (f.eks. $EC_{15}$, $EC_{50}$ osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment samt stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)

— emergensen af C. riparius og C. yoshimatsui til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for C. tentans kræves der en periode på 20-65 dage

— ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas

— vandtemperaturen må højst variere med ± 1,0 °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

▼M4

BESKRIVELSE AF METODEN

**Testglas**

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 $cm^2$ pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

**Valg af fiskeart**

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis Chironomus riparius. Chironomus tentans kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Chironomus yohimatsui kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende Chironomus riparius. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. Chironomus tentans (4) og Chironomus yoshimatsui (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

**Sediment**

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret

b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm)

d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %

e) kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5. Det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

▼M4

**Vand**

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som $CaCO_3$. Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

**Stamopløsninger — forurenet sediment**

16. Forurenet sediment af den valgte koncentration fremstilles sædvanligvis ved, at en stamopløsning af teststoffet tilsættes sedimentet direkte. En stamopløsning af teststoffet opløst i deioniseret vand blandes med det formulerede sediment ved brug af valsning, en foderblander eller manuel blanding. Hvis teststoffet er tungtopløseligt i vand, kan det opløses i den mindst mulige mængde af et passende organisk opløsningsmiddel (f.eks. hexan, acetone eller chloroform). Denne opløsning blandes derefter med 10 g fint kvartssand til et testglas. Vent, indtil opløsningsmidlet er fordampet, og fjern det helt fra sandet. Derefter blandes sandet med den passende mængde sediment pr. testglas. Kun midler, der let fordamper, kan bruges til at opløse, dispergere eller emulgere teststoffet. Det sand, der findes i teststoffet og sandblandingen, skal tages i betragtning, når sedimentet fremstilles (dvs. sediment skal således fremstilles med mindre sand). Det skal sikres, at det teststof, der tilsættes sediment, fordeles grundigt og jævnt i sedimentet. Om nødvendigt kan delprøver analyseres for at bestemme homogeniteten.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives.

**Design til regressionsanalyse**

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{15}$, $EC_{50}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer ($EC_x$) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet. Ekstrapolering langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).

▼M4

19. Hvis $EC_x$ skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

**Design til beregning af NOEC/LOEC**

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

**Grænsetest**

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at udføre en test ved en koncentration, der er høj nok til, at beslutningstagere kan udelukke mulige toksiske virkninger af teststoffet, og grænsen fastsættes til en koncentration, der ikke forventes at forekomme under nogen omstændigheder. 1 000 mg/kg (tørvægt) anbefales. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whithey-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

**Eksponeringsbetingelser**

*Klargøring af forurenet sediment/vand-system*

22. Den spiking-metode, der er beskrevet i testmetode C.8, Toksicitet for regnorme, anbefales til tilsætning af teststoffet (14). De »spikede« (forurenede) sedimenter anbringes i bægerglas, og overliggende vand tilsættes for at frembringe et volumenforhold mellem sediment og vand på 1:4 (se afsnit 11 og 15). Sedimentlaget skal have en dybde på 1,5-3 cm. For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

▼M4

*Stabilisering*

24. Når det forurenede sediment med overliggende vand er blevet fremstillet, afventes det, at teststoffet fordeler sig fra den vandige fase til sedimentet (3) (4) (6) (13). Dette bør ske under de temperatur- og beluftningsforhold, der anvendes i testen. Tiden til opnåelse af ligevægt (ækvilibrering) afhænger af det pågældende sediment og kemikalie og kan være fra timer til dage og i sjældne tilfælde flere uger (4-5 uger). Da mange kemikalier i dette tidsrum ville blive nedbrudt, afventes ligevægt ikke, men en ækvilibreringstid på 48 timer anbefales. Efter denne yderligere ækvilibreringstid måles koncentrationen af teststoffet i det overliggende vand, porevandet og sedimentet, som minimum ved den højeste koncentration og en lavere (se afsnit 38). Disse analyser af teststoffet gør det muligt at beregne massebalance og angive resultater baseret på målte koncentrationer.

*Tilsætning af testorganismer*

25. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for Chironomus riparius ved 20 °C og 1-4 dage for Chironomus tentans ved 23 °C og Chironomus yoshimatui ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).

26. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenet sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 25 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.

*Testkoncentrationer*

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.

28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

▼M4

*Kontroller*

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

*Testsystem*

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

*Foder*

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for C. yoshimatui) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log $K_{ow}$ > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (Urtica dioica), morbærtræ (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens) eller spinat (Spinacia oleracea). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

*Inkubationsbetingelser*

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.

33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For C. tentans og C. yoshimatui anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

▼M4

*Eksponeringsvarighed*

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 65 dage for C. tentans. Hvis dansemyg udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

**Observationer**

*Emergens*

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnet og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

*Vækst og overlevelse*

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 μm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tørvægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

**Analysemålinger**

*Teststofkoncentration*

38. Inden testen påbegyndes (dvs. inden larver tilsættes), udtages prøver af bulksediment fra mindst ét glas pr. behandling til analytisk bestemmelse af teststofkoncentrationen i sedimentet. Det anbefales, at prøver af som minimum det overliggende vand, porevandet og sedimentet analyseres ved begyndelsen (se afsnit 24) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet.

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

▼M4

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

*Fysisk-kemiske parametre*

41. Testglassenes pH og temperatur måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

*Behandling af resultater*

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en $\chi^2$-r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.

43. Effektkoncentrationer udtrykt og baseret på tørvægt beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).

44. For at beregne et punktestimat for $EC_{50}$ eller en anden $EC_x$-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en $EC_x$-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. $EC_x$-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.

45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

*Emergensforhold*

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosis-respons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indicerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).

▼**M4**

Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, $n_e$, bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, $n_a$:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

hvor:

$ER$ = emergensforhold

$n_e$ = antal udviklede individer pr. glas

$n_a$ = antal tilførte larver pr. glas

47. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binominal varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuerligt respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosisrespons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).

48. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.

49. I forbindelse med emergensforhold beregnes $EC_x$-værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

*Udviklingshastighed*

50. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning). Udviklingshastigheden er det reciprokke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuerligt respons kan $EC_x$-værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).

51. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag × og dag x-l (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas ($x$) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼**M4**

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i: indeks for inspektionsinterval

*m*: maksimalt antal inspektionsintervaller

$f_i$: antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

$n_e$: det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget ($= \sum f_i$)

$x_i$: udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

hvor:

$day_i$: inspektionsdag (siden behandling)

$l_i$: længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

**Testrapport**

52. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

*Teststof:*

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

*Testart:*

— anvendte testorganismer: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser

— information om håndtering af ægmasser og larver

— testorganismernes alder ved tilsætning til testglas.

*Testbetingelser:*

— anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment

— for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)

— fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)

— fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)

— dybde af sediment og overliggende vand

— volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand

▼M4

— testglas (materiale og størrelse)

— metode til sedimentspiking: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel

— stabiliserende ligevægtsfase for det spikede sediment/vand-system: varighed og betingelser

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

*Resultater:*

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset

— kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak

— evt. udskiftning af fordampet vand

— antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag

— antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas

— individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant

— procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)

— gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)

— estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. $EC_x$ (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

*LITTERATUR:*

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate;Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(15) Suedel BC og JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C og C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

**Formuleret sediment** eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

**Overliggende vand**: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

**Interstitielt vand** eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

**Spiked sediment** eller forurenet sediment: sediment, som teststoffet er tilsat.

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

*Tillæg 2*

**Anbefalinger vedrørende dyrkning af Chironomus riparius**

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

**Fortyndingsvand**

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkingsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

**Fodring af larver**

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.

5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.

6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

**Fodring af udviklede voksne**

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

▼M4

**Emergens**

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

***Ægmasser***

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.

10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

**Etablering af nye dyrkningsglas**

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

**Fremstilling af testopløsninger M4 og M7**

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ og $K_2HPO_4$, idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

**Fremstilling af M7-mediet**

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

*LITTERATUR*

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

*Tabel 1*

**Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne**

| Stamopløsninger (I) | Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand | Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand | | Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| Kl | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.
(2) Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

*Tabel 2*

**Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne**

| | Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg) | Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l) | Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Tabel 3*

**Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne. Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.**

| | Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg) | Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l) | Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamin (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotin | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*LITTERATUR*

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Tillæg 3*

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

**Sammensætning af sediment**

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

| Bestanddel | Karakteristika | % af sediment (tørvægt) |
|---|---|---|
| Tørv | Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret | 4-5 |
| Kvartssand | Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm | 75-76 |
| Kaolinholdigt ler | Kaolinindhold ≥ 30 % | 20 |
| Organisk kulstof | Justeres ved tilsætning af tørv og sand | 2 (± 0,5) |
| Calciumcarbonat | $CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent | 0,05-0,1 |
| Vand | Ledeevne ≤ 10 μS/cm | 30-50 |

**Fremstilling**

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med $CaCO_3$. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

**Opbevaring**

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

*LITTERATUR*

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

*Tillæg 4*

**Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding**

| Stof | Koncentrationer |
|---|---|
| Faste stoffer | < 20 mg/l |
| Totalt organisk kulstof | < 2 mg/l |
| Ikke-ioniseret ammoniak | < 1 µg/l |
| Hårdhed som $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Residualt chlor | < 10 µg/l |
| Total organiske phosphorpesticider | < 50 ng/l |
| Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler | < 50 ng/l |
| Total organisk chlor | < 25 ng/l |

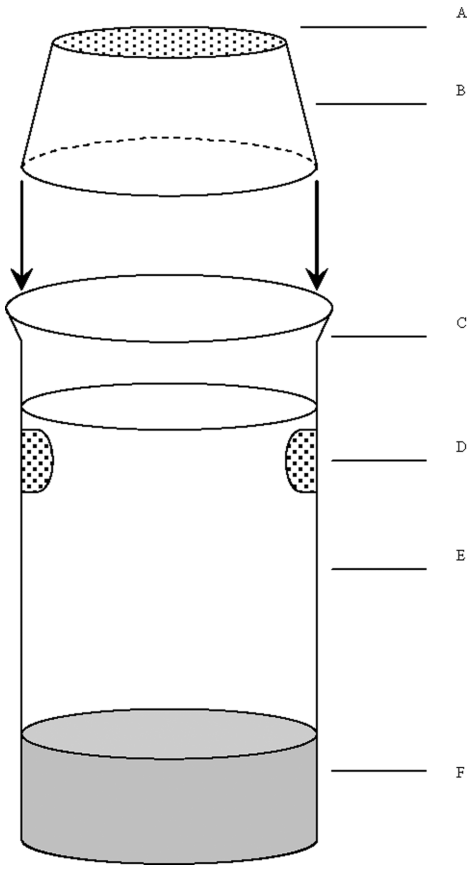
(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

▼**M4**

*Tillæg 5*

**Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver**

Emergensfiltre anbringes på testbægerglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:




A: Nylonvæv

B: Omvendte plastbægre

C: Eksponeringsbæger uden flange

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

E: Vand

F: Sediment

▼M4

## C. 28. TOKSICITETSTEST SEDIMENT/VAND PÅ CHIRONOMIDER MED FORURENET VAND

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD TG 219 (2004). Formålet med denne test er at vurdere virkningerne på larver af ferskvandsdipteraen Chironomus sp., der lever i sediment, af forlænget eksponering for kemikalier. Den er primært baseret på BBA-vejledningen, der anvender et sediment- og vandtestsystem med syntetisk jord, og et vandsøjleeksponeringsscenario (1). Den inddrager også de eksisterende toksicitetstestprotokoller for Chironomus riparius og Chironomus tentans, der er blevet udviklet i Europa og Nordamerika (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) og ringtestet (1) (6) (9). Andre veldokumenterede chironomidarter kan også benyttes, f.eks. Chironomus yoshimatsui (10) (11).

2. Eksponeringsscenariet i denne testmetode er spiking (forurening) af vand. Valget af det mest velegnede eksponeringsscenario afhænger af, hvad testen skal anvendes til. Vandeksponeringsscenariet, hvor vandsøjlen spikes, har til formål at simulere et tilfælde af aerosolspredning af pesticider og dækker den første koncentrationstop i porevand. Det kan også anvendes i forbindelse med andre typer eksponering (herunder kemiske udslip) med undtagelse af akkumuleringsprocesser, der varer længere end testperioden.

3. Stoffer, der skal testes i forbindelse med organismer, der lever i sediment, forefindes normalt i dette rum over længere tid. Organismer, der lever i sediment, kan eksponeres ad forskellige veje. Den relative vigtighed af den enkelte eksponeringsvej og den tid, der tager for hver enkelt at bidrage til de generelle toksiske virkninger, afhænger af de fysisk-kemiske egenskaber af det pågældende kemikalie. Ved stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log $K_{ow}$ > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, kan indtagelse af kontamineret føde være en væsentlig eksponeringsvej. For ikke at undervurdere toksiciteten af højt lipofile stoffer kan det overvejes at tilsætte foder til sedimentet før tilsætning af teststoffet. For at tage alle potentielle eksponeringsveje i betragtning fokuserer denne testmetode på langtidseksponering. Testens varighed er 20-28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 28-65 dage for C. tentans. Hvis der kræves korttidsdata til særlige formål, f.eks. for at undersøge virkningerne af et ustabilt kemikalie, kan yderligere replikater fjernes efter en periode på 10 dage.

4. De målte effektparametre er det samlede antal voksne, der har udviklet sig, og tiden, der er gået med udvikling. Det anbefales, at målinger af larvers overlevelse og vækst kun udføres efter en periode på 10 dage, hvis der kræves yderligere korttidsdata, ved hjælp af eventuelle yderligere replikater.

5. Det anbefales at anvende formuleret sediment. Der er flere fordele ved formuleret sediment i forhold til naturlige sedimenter:

— udsvingene i forsøgene reduceres, idet der dannes en reproducerbar »standardiseret matrix«, og der er ikke brug for at finde ikke-kontaminerede og rene sedimentkilder

— testene kan indledes på ethvert tidspunkt, uden at der opstår sæsonbetingede udsving i testsedimentet, og der er ikke behov for at forbehandle sedimentet med henblik på at fjerne hjemmehørende fauna; brugen af formuleret sediment reducerer også omkostningerne i forbindelse med opsamling af tilstrækkelige mængder sediment i felten til rutinetest

▼M4

— anvendelsen af formuleret sediment gør det muligt at sammenligne toksicitet og rangordne stoffer i overensstemmelse hermed toksicitetsdata fra test med naturlige og kunstige sedimenter var sammenlignelige for flere kemikalier (2).

6. De anvendte definitioner er anført i tillæg 1.

TESTENS PRINCIP

7. Æglarver af chironomider eksponeres for et koncentrationsinterval af teststoffet i sediment/vand-systemer. Testen indledes med, at æglarver anbringes i testbægerglas, som indeholder sediment/vand-systemet, og derefter tilsættes teststoffet vandet. Emergens- og udviklingstiden for chironomider måles ved afslutningen af testen. Larvernes overlevelse og vægt kan om nødvendigt også måles efter 10 dage (ved brug af yderligere replikater). Disse data analyseres ved hjælp af en regressionsmodel for at anslå den koncentration, der vil forårsage en reduktion på × % i emergens, larveoverlevelse eller larvevækst (f.eks. $EC_{15}$, $EC_{50}$ osv.), eller ved hjælp af statistisk hypotesetest med henblik på at bestemme en NOEC/LOEC. Sidstnævnte kræver sammenligning af effektværdier med kontrolværdier ved hjælp af statistiske test.

OPLYSNINGER OM TESTSTOFFET

8. Teststoffets vandopløselighed, damptryk, målt eller beregnet, fordeling i sediment og stabilitet i vand og sediment bør kendes. En pålidelig analysemetode til kvantificering af teststoffet i overliggende vand, porevand og sediment med kendt og publiceret nøjagtighed og nedre målegrænse bør foreligge. Nyttige oplysninger omfatter teststoffets strukturformel og renhed. Teststoffets kemiske skæbne (f.eks. spredning, abiotisk og biotisk nedbrydning osv.) er også nyttige oplysninger. For stoffer, der er vanskelige at teste som følge af deres fysisk-kemiske egenskaber, findes der yderligere vejledning i (12).

REFERENCEKEMIKALIER

9. Referencekemikalier kan testes periodisk for at sikre, at testprotokollen og -betingelserne er pålidelige. Eksempler på referencetoksikanter, der er anvendt med godt resultat i ringtest og valideringsforsøg, omfatter lindan, trifluralin, pentachlorphenol, cadmiumchlorid og kaliumchlorid (1) (2) (5) (6) (13).

TESTENS VALIDITET

10. Testens validitet forudsætter følgende:

— emergensen i kontrolbeholderne skal være mindst 70 % ved testens afslutning (1) (6)

— emergensen af C. riparius og C. yoshimatsui til voksne fra kontrolglassene skal ske mellem 12 og 23 dage efter deres overførsel til testglassene; for C. tentans kræves der en periode på 20-65 dage

— ved testens afslutning måles pH og koncentrationen af opløst ilt i hvert bægerglas. Koncentrationen af opløst ilt skal være mindst 60 % af værdien for mætning med luft (ASV) ved den anvendte temperatur, og pH i det overliggende vand skal være i intervallet 6-9 i alle bægerglas

▼M4

— vandtemperaturen må højst variere med ± 1,0 °C. Vandtemperatur kan styres ved at anvende et isotermisk rum, og i det tilfælde bekræftes rumtemperaturen med passende tidsintervaller.

BESKRIVELSE AF METODEN

**Testglas**

11. Forsøget udføres i 600 ml bægerglas med en diameter på 8 cm. Andre beholdere kan anvendes, men de skal kunne sikre en passende dybde for det overliggende vand og sediment. Sedimentoverfladen skal være tilstrækkelig (2 til 3 $cm^2$ pr. larve). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af det overliggende vand skal være 1:4. Testglas og andet udstyr, der kommer i berøring med testsystemet, skal være udført helt i glas eller andet kemisk inaktivt materiale (f.eks. Teflon).

**Valg af fiskeart**

12. Den art, der skal benyttes i testen, er fortrinsvis Chironomus riparius. Chironomus tentans kan også anvendes, men er vanskeligere at håndtere og kræver en længere testperiode. Chironomus yohimatsui kan også anvendes. Detaljer om dyrkningsmetoder findes i tillæg 2 vedrørende Chironomus riparius. Oplysninger om dyrkningsbetingelser findes også for andre arter, dvs. Chironomus tentans (4) og Chironomus yoshimatsui (11). Identifikation af arten skal bekræftes inden testning, men kræves ikke før hver test, hvis organismer kommer fra en intern bestand.

**Sediment**

13. Formuleret sediment (også kaldet rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment) bør fortrinsvis anvendes. Hvis naturligt sediment anvendes, skal det karakteriseres (som minimum ved hjælp af pH og organisk kulstofindhold, men andre parametre anbefales også, f.eks. C/N-forhold og kornstørrelse), og det bør være uden forurening og andre organismer, der kan konkurrere med eller æde chironomiderne. Inden naturligt sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det desuden konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test. Det anbefales at bruge følgende formulerede sediment, som er baseret på den syntetiske jord, der anvendes i testmetode C.8 (14), i denne test (1) (15) (16):

a) 4-5 % (tørvægt) tørv: så tæt på pH 5,5 til 6,0 som muligt; det er vigtigt at bruge pulveriseret tørv, findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og kun lufttørret

b) 20 % (tørvægt) kaolinholdigt ler, helst med over 30 % kaolinit

c) 75-76 % (tørvægt) kvartssand (overvejende finsand med over 50 % af en partikelstørrelse på 50 til 200 μm)

d) deioniseret vand tilsættes for at få et fugtindhold i den færdige blanding på 30-50 %

e) kemisk rent calciumcarbonat ($CaCO_3$) tilsættes for at få en pH-værdi i den færdige sedimentblanding på 7,0 ± 0,5

f) det organiske kulstofindhold i den færdige blanding skal være 2 % (± 0,5 %), og det justeres ved brug af passende mængder tørv og sand som anført i litra a) og c).

▼M4

14. Oprindelsen af tørv, kaolinler og sand skal være kendt. Det kontrolleres, at sedimentkomponenterne ikke indeholder kemisk forurening (f.eks. tungmetaller, organiske chlorforbindelser, organiske phosphorforbindelser osv.). Et eksempel på fremstilling af formuleret sediment er beskrevet i tillæg 3. Blanding af tørre bestanddele accepteres også, hvis det påvises, at der ikke sker en separation af sedimentets bestanddele efter tilsætning af overliggende vand (f.eks. at tørvepartikler flyder ovenpå), og at tørven eller sedimentet er tilstrækkeligt konditioneret.

**Vand**

15. Til brug i testen kan anvendes vand, der er i overensstemmelse med de kemiske karakteristika for acceptabelt fortyndingsvand, som beskrevet i tillæg 2 og 4. Som dyrknings- og fortyndingsvand kan accepteres råvand (overflade- eller grundvand), rekonstitueret vand (se tillæg 2) eller afkloret ledningsvand, såfremt chironomider kan overleve i vandet i et tidsrum svarende til dyrknings- og testperioden uden at vise tegn på stress. Ved testens begyndelse skal testvandet have en pH-værdi på 6-9 og en hårdhedsgrad på højst 400 mg/l som $CaCO_3$. Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation). Den samme type vand skal anvendes i hele forsøget. De karakteristika for vandkvalitet, der er anført i tillæg 4, måles to gange årligt, samt hver gang der er formodning om, at de kan have ændret sig væsentligt.

**Stamopløsninger — forurenet vand**

16. Testkoncentrationer beregnes på grundlag af vandsøjlekoncentrationer, dvs. vandet over sedimentet. Testopløsninger med de valgte koncentrationer fremstilles almindeligvis ved fortynding af en stamopløsning. Stamopløsninger fremstilles fortrinsvis ved at opløse teststoffet i testmediet. Anvendelse af opløsningsmidler eller dispergeringsmidler kan i nogle tilfælde være nødvendig for at fremstille en stamopløsning med en passende koncentration. Som opløsningsmiddel kan der benyttes acetone, ethanol, methanol, ethylenglycolmonomethylether, ethylenglycoldimethylether, dimethylformamid eller triethylenglycol. Som dispergeringsmiddel kan benyttes Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose eller HCO-40. Koncentrationen af opløselighedsfremmere i det færdige testmedium skal være så lille som muligt (dvs. $\leq$ 0,1 ml/l) og bør være den samme i alle behandlingsprøver. Når der anvendes en opløselighedsfremmer, må den ikke have nogen signifikant virkning på overlevelsen eller synlig negativ virkning på chironomidlarven, hvilket kan afsløres ved en kontroltest, hvor kun opløsningsmidlet anvendes. Der skal ydes enhver indsats for at undgå brugen af sådanne materialer.

TESTDESIGN

17. Testdesignet vedrører valget af testkoncentrationernes antal og intervaller, antal testglas med hvert koncentrationsniveau samt antal larver pr. testglas. Design til beregning af EC-punkter, beregning af NOEC og gennemførelse af en grænsetest beskrives. Regressionsanalyse foretrækkes frem for hypotesetest.

*Design til regressionsanalyse*

18. Testen skal omfatte et interval af koncentrationer, der ligger omkring den virksomme koncentration (f.eks. $EC_{15}$, $EC_{50}$) og det koncentrationsområde, hvor man er interesseret i testkemikaliets virkning. Beregningen af de virksomme koncentrationer ($EC_x$) vil være mest nøjagtig og gyldig, når den virksomme koncentration befinder sig midt i testkoncentrationsområdet.

▼M4

Ekstrapolering langt under den laveste positive koncentration eller over den højeste koncentration bør undgås. En præliminær test til bestemmelse af koncentrationsområdet kan være nyttig, når det skal afgøres, hvilke testkoncentrationer der er passende (se afsnit 27).

19. Hvis $EC_x$ skal bestemmes, skal der testes mindst fem koncentrationer og tre replikater for hver koncentration. Under alle omstændigheder bør der anvendes et tilstrækkeligt antal testkoncentrationer til at sikre god modelestimering. Faktoren mellem koncentrationer bør ikke overstige to (medmindre dosiskurven har en lav hældning). Antallet af replikater i hver behandling kan reduceres, hvis antallet af testkoncentrationer med forskellige reaktioner forøges. Hvis antallet af replikater forøges, eller størrelsen af testkoncentrationsintervallerne reduceres, opnås der ofte snævrere konfidensintervaller for testen. Der kræves yderligere replikater, hvis larveoverlevelse og -vækst skal anslås for en periode på 10 dage.

*Design til beregning af NOEC/LOEC*

20. Hvis LOEC eller NOEC skal beregnes, anvendes fem testkoncentrationer med mindst fire replikater, og faktoren mellem koncentrationerne bør højst være to. Antallet af replikater bør være højt nok til at sikre en tilstrækkelig statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05). I forbindelse med udviklingshastigheden er en ANOVA-analyse normalt velegnet, f.eks. Dunnett-testen eller Williams-testen (17) (18) (19) (20). I forbindelse med emergensforholdet kan Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen anvendes.

*Grænsetest*

21. En grænsetest kan udføres (med en testkoncentration og kontrol), hvis der ikke blev observeret virkninger i den præliminære test til bestemmelse af koncentrationsområdet. Formålet med grænsetesten er at indicere, at teststoffets toksiske værdi er større end den testede grænsekoncentration. En anbefalet koncentration kan ikke foreslås i forbindelse med denne testmetode. Det overlades til myndighedernes vurdering. Der anbefales normalt seks replikater for både behandlings- og kontrolgruppen. Statistisk styrke til at detektere en forskel på 20 % i forhold til kontrollen på signifikansniveauet 5 % (p = 0,05) skal påvises. Med hensyn til metrisk respons (udviklingshastighed og vægt) er t-testen en egnet statistisk metode, hvis dataene opfylder kravene i forbindelse med denne test (normalitet og homogen varians). T-testen justeret for forskel i varians eller en ikke-parametrisk test, f.eks. Wilcoxon-Mann-Whithey-testen, kan bruges, hvis disse krav ikke opfyldes. Med hensyn til emergensforholdet kan Fishers eksakte test anvendes.

FREMGANGSMÅDE

**Eksponeringsbetingelser**

*Klargøring af forurenet vand- og sedimentsystem*

22. Passende mængder formuleret sediment (se afsnit 13-14 og tillæg 3) tilsættes testglasset, så der dannes et lag på mindst 1,5 cm. Vand tilsættes, så der fås en dybde på 6 cm (se afsnit 15). Forholdet mellem dybden af sedimentlaget og dybden af vandet må ikke overstige 1:4, og sedimentlaget må ikke være dybere end 3 cm. Sediment/vand-systemet hensættes til forsigtig beluftning i syv dage inden testorganismer tilsættes (se afsnit 14 og tillæg 3). For at undgå separering af sedimentets bestanddele og resuspension af fint materiale under tilsætningen af testvand i vandsøjlen, kan sedimentet overdækkes med en plastplade, mens vandet hældes i. Plastpladen fjernes derefter straks. Der kan også anvendes andre løsninger.

▼M4

23. Testglassene skal være overdækket (f.eks. af glasplader). I løbet af forsøget påfyldes der yderligere vand for at bevare det oprindelige volumen og kompensere for vandfordampning. Dette vand skal være destilleret eller deioniseret vand for at forhindre opbygning af salte.

*Tilsætning af testorganismer*

24. Fire til fem dage inden tilsætningen af testorganismer til testglassene udtages ægmasse fra bestandene og anbringes i små glas i dyrkningsmedium. Ældet dyrkningsmedium fra stamkulturen eller frisk medium kan anvendes. Hvis sidstnævnte anvendes, tilsættes dyrkningsmediet en lille mængde foder, f.eks. grønalger og/eller et par dråber filtrat fra en fintmalet suspension af fiskefoder i flager (se tillæg 2). Kun frisklagte ægmasser bør anvendes. Normalt begynder larverne at blive udklækket et par dage efter æglægningen (2-3 dage for Chironomus riparius ved 20 °C og 1-4 dage for Chironomus tentans ved 23 °C og Chironomus yoshimatui ved 25 °C), og larvevækst sker i fire stadier, som hver er af 4-8 dages varighed. Larver i første stadium (2-3 eller 1-4 dage efter udklækning) bør anvendes i testen. Larver af dansemyg kan muligvis kontrolleres ved hjælp af hovedkapselbredde (6).

25. 20 æglarver fordeles vilkårligt til hvert testglas med forurenet sediment og vand ved hjælp af en stump pipette. Beluftningen af vandet skal standses, mens larverne overføres til testglassene, og den skal være standset i endnu 24 timer efter tilsætningen af larver (se afsnit 24 og 32). Afhængigt af det anvendte testdesign (se afsnit 19 og 20) anvendes der mindst 60 larver pr. koncentration i forbindelse med bestemmelse af EC-punkter og 80 til bestemmelse af NOEC.

26. 24 timer efter tilsætning af larverne tilsættes teststoffet i den overliggende vandsøjle, og let beluftning tilføres igen. Små mængder af teststofopløsninger tilsættes under vandoverfladen ved hjælp af en pipette. Det overliggende vand blandes derefter forsigtigt, idet det undgås at forstyrre sedimentet.

*Testkoncentrationer*

27. En test til bestemmelse af koncentrationsområde kan være nyttig, når koncentrationsområdet skal vælges til den endelige test. Til det formål anvendes en række spredte koncentrationer af teststoffet. For at opnå den overfladedensitet pr. chironomide, der anvendes i den endelige test, eksponeres chironomider for hver koncentration af teststoffet i en periode, der gør det muligt at anslå de omtrentlige testkoncentrationer, og der kræves ingen replikater.

28. Testkoncentrationerne i den endelige test fastlægges ud fra testen til bestemmelse af koncentrationsområde. Mindst fem koncentrationer anvendes og vælges som beskrevet i afsnit 18-20.

*Kontroller*

29. Kontrolglas uden teststof, men med sediment, inkluderes i testen med et hensigtsmæssigt antal replikater (se afsnit 19-20). Hvis der er anvendt et opløsningsmiddel til tilsætning af teststoffet (se afsnit 16), anvendes også en opløsningsmiddelkontrol.

▼M4

*Testsystem*

30. Der anvendes statiske systemer. Semistatiske systemer eller gennemstrømningssystemer med intermitterende eller kontinuerlig udskiftning af overliggende vand kan undtagelsesvis bruges, hvis specifikationerne for vandkvalitet bliver uhensigtsmæssige for testorganismen eller påvirker den kemiske ligevægt (hvis f.eks. koncentrationen af opløst ilt bliver for lav, koncentrationen af ekskretionsprodukter bliver for høj, eller mineraler udvaskes fra sedimentet og påvirker pH og/eller vandets hårdhed). Andre metoder til forbedring af det overliggende vands kvalitet, f.eks. beluftning, er normalt tilstrækkelige og bør foretrækkes.

*Foder*

31. Larverne skal fodres, helst dagligt eller mindst tre gange om ugen. Fiskefoder (en suspension i vand eller fintmalet foder, f.eks. Tetra-Min eller Tetra-Phyll; se detaljer i tillæg 2) i en mængde på 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg for C. yoshimatui) pr. larve pr. dag er tilstrækkelig til unge larver i de første 10 dage. Ældre larver skal have lidt mere foder: 0,5-1 mg pr. larve pr. dag er passende i resten af testen. Foderrationen skal reduceres i alle behandlingsprøver og reguleres, hvis der konstateres svampevækst, eller hvis mortalitet observeres i kontrolglassene. Hvis svampevæksten ikke kan stoppes, gentages testen. Ved test af stærkt adsorberende stoffer (f.eks. med log $K_{ow}$ > 5) eller ved stoffer, der kovalent bindes til sediment, skal den mængde foder, der er nødvendig for at sikre organismernes overlevelse og naturlige vækst, muligvis tilsættes det formulerede sediment inden stabiliseringsperioden. Til det formål anvendes der plantemateriale i stedet for fiskefoder, f.eks. tilsætning af 0,5 % (tørvægt) fintmalede blade af brændenælde (Urtica dioica), morbærtræ (Morus alba), hvidkløver (Trifolium repens) eller spinat (Spinacia oleracea). Andet plantemateriale (Cerophyl eller alfa-cellulose) kan også anvendes.

*Inkubationsbetingelser*

32. Forsigtig beluftning af det overliggende vand i testglassene foretages helst 24 timer efter tilsætningen af larver og foretages gennem hele testen. Det skal sikres, at koncentrationen af opløst ilt ikke falder til mindre end 60 % af ASV. Beluftning sker gennem en Pasteur-glaspipette, der er fastgjort 2-3 cm over sedimentlaget (dvs. en eller få bobler pr. sekund). Ved test af flygtige kemikalier kan det overvejes ikke at belufte sediment/vand-systemet.

33. Testen udføres ved en konstant temperatur på 20 °C (± 2 °C). For C. tentans og C. yoshimatui anbefales en temperatur på henholdsvis 23 °C og 25 °C (± 2 °C). Der anvendes en lysperiode på 16 timer, og lysintensiteten skal være 500-1 000 lux.

*Eksponeringsvarighed*

34. Eksponeringen begynder, når larver tilsættes de forurenede bægerglas og kontrolglassene. Den maksimale eksponeringsvarighed er 28 dage for C. riparius og C. yoshimatsui og 65 dage for C. tentans. Hvis dansemyg udvikles tidligere, kan testen afsluttes, når der er gået mindst fem dage efter emergensen af den sidste voksne i kontrolglasset.

OBSERVATIONER

*Emergens*

35. Udviklingstiden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider bestemmes. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

▼M4

36. Testglassene observeres mindst tre gange ugentligt med henblik på visuelt at vurdere abnorm opførsel (hvis individer f.eks. forlader sediment eller svømmer på en usædvanlig måde) sammenlignet med kontrollen. I løbet af perioden for forventet emergens foretages en daglig tælling af de udviklede individer. Kønnet og antallet af fuldt udviklede individer registreres dagligt. Efter identifikation fjernes individerne fra bægerglassene. Ægmasse, der er afsat før afslutningen af testen, registreres og fjernes derefter for at forhindre gentaget tilførsel af larver til sedimentet. Antallet af synlige pupper, der ikke har udviklet sig, registreres også. Vejledning i måling af emergens findes i tillæg 5.

*Vækst og overlevelse*

37. Hvis der skal fremlægges data om larveoverlevelse og -vækst efter 10 dage, skal yderligere testglas medtages fra begyndelsen, så de kan anvendes efterfølgende. Sedimentet fra disse yderligere glas sigtes gennem en 250 μm sigte for at tilbageholde larverne. Kriterier for død er immobilitet eller manglende reaktion på mekaniske stimuli. Larver, der ikke genfindes, registreres også som døde (larver, der er døde ved begyndelsen af testen, kan være blevet nedbrudt af mikrober). Tørvægten (askefri) af de overlevende larver pr. testglas bestemmes, og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas beregnes. Det er nyttigt at bestemme det stadium, som de overlevende larver befinder sig på. Til det formål anvendes en måling af bredden på hvert individs hovedkapsel.

**Analysemålinger**

*Teststofkoncentration*

38. Som minimum analyseres prøver af det overliggende vand, porevandet og sedimentet ved begyndelsen (helst en time efter tilsætning af teststoffet) og slutningen af testen ved den højeste koncentration og en lavere. Disse bestemmelser af teststofkoncentrationen giver oplysninger om teststoffets opførsel/fordeling i vand- og sedimentsystemet. Prøvetagning af sediment ved begyndelsen af testen kan påvirke testsystemet (f.eks. fjerne testlarver), og derfor bør der anvendes yderligere testglas til udførelsen af analysebestemmelser ved begyndelsen af og i løbet af testen, hvis det er hensigtsmæssigt (se afsnit 39). Målinger i sediment er muligvis ikke nødvendige, hvis fordelingen af teststoffet mellem vand og sediment er blevet tydeligt bestemt i et vand- og sedimentforsøg under lignende betingelser (f.eks. forhold mellem vand og sediment, anvendelsestype og organisk kulstofindhold i sediment).

39. Når der foretages mellemliggende målinger (f.eks. på dag 7), og hvis der i analysen skal bruges større prøver, der ikke kan udtages fra testglas uden at påvirke testsystemet, udføres de analytiske bestemmelser på prøver fra yderligere testglas, der er behandlet på samme måde (herunder tilstedeværelse af testorganismer), men som ikke anvendes til biologiske observationer.

40. Centrifugering ved f.eks. 10 000 g og 4 °C i 30 minutter er den anbefalede fremgangsmåde til isolering af interstitielt vand. Hvis det påvises, at teststoffet ikke adsorberer til filtre, kan filtrering dog accepteres. I nogle tilfælde er det ikke muligt at analysere koncentrationer i porevandet, da prøvestørrelsen er for lille.

▼M4

*Fysisk-kemiske parametre*

41. Testglassenes pH og temperatur samt opløst ilt i vandet måles på en hensigtsmæssig måde (se afsnit 10). Hårdhed og ammoniak måles i kontrolglassene og et testglas ved den højeste koncentration ved begyndelsen og afslutningen af testen.

DATA OG RAPPORTERING

*Behandling af resultater*

42. Formålet med denne test er at bestemme virkningen af teststoffet på udviklingshastigheden og det samlede antal fuldt udviklede han- og hunindivider eller virkningen på larvernes overlevelse og vægt, hvis en 10-dages test udføres. Hvis der ikke er indikationer på statistisk forskellige sensitiviteter mellem kønnene, kan resultaterne for hanner og hunner samles med henblik på statistisk analyse. Kønsbetingede sensitivitetsforskelle kan vurderes statistisk ved hjælp af f.eks. en $\chi^2$-r × 2-test. Larvernes overlevelse og den individuelle gennemsnitlige tørvægt pr. glas bestemmes om nødvendigt efter 10 dage.

43. Effektkoncentrationer udtrykt som koncentrationer i det overliggende vand beregnes fortrinsvis ud fra målte sedimentkoncentrationer ved begyndelsen af testen (se afsnit 38).

44. For at beregne et punktestimat for $EC_{50}$ eller en anden $EC_x$-værdi bruges data pr. glas som ægte replikater. Når et konfidensinterval for en $EC_x$-værdi beregnes, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, eller det skal påvises, at denne variabilitet er så lille, at den kan ignoreres. Når modellen tilpasses ved hjælp af Least Squares, foretages en transformation af dataene pr. glas for at forbedre varianshomogeniteten. $EC_x$-værdier beregnes dog, når resultatet er transformeret tilbage til den oprindelige værdi.

45. Når den statistiske analyse har til formål at bestemme NOEC/LOEC ved hjælp af hypotesetest, skal variabiliteten mellem glassene tages i betragtning, f.eks. ved hjælp af nested ANOVA. Alternativt kan mere robuste test (21) bruges i situationer, hvor de sædvanlige ANOVA-antagelser ikke kan anvendes.

*Emergensforhold*

46. Emergensforhold er kvantale data og kan analyseres ved at anvende Cochran-Armitage-testen på en nedadgående måde, hvor et monotont dosis-respons forventes, og disse data er i overensstemmelse med denne forventning. Hvis det ikke er tilfældet, kan Fishers eksakte test eller Mantel-Haenszel-testen med Bonferroni-Holm-korrigerede p-værdier anvendes. Hvis der er bevis for større variabilitet mellem replikater inden for samme koncentration, end en binominal fordeling indicerer (ofte betegnet som »ekstra-binominal« variation), anvendes en robust Cochran-Armitage-test eller Fishers eksakte test som foreslået i (21).

47. Summen af individer, der har udviklet sig pr. glas, $n_e$, bestemmes og divideres med antallet af tilførte larver, $n_a$:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

hvor:

$ER$ = emergensforhold

$n_e$ = antal udviklede individer pr. glas

$n_a$ = antal tilførte larver pr. glas

48. Ved store prøvestørrelser, hvor der er ekstra-binominal varians, kan emergensforholdet behandles som et kontinuerligt respons, og der kan bruges fremgangsmåder, som f.eks. Williams test, når et monotont dosisrespons forventes og er i overensstemmelse med disse ER-data. Dunnetts test kan anvendes, hvis der ikke kan påvises monotoni. Et stor prøvestørrelse defineres her som prøver, hvor både antallet af udviklede individer og antallet af ikke-udviklede individer overstiger fem målt pr. replikat (glas).

49. Hvis ANOVA-metoder anvendes, skal ER-værdier først transformeres ved hjælp af arcsin-sqrt-transformation eller Freeman-Tukey-transformation for at få en omtrentlig normalfordeling og udligne varians. Cochran-Armitage-testen, Fishers eksakte test (med Bonferroni-korrektion) eller Mantel-Haenszel-testen kan anvendes, hvis absolutte hyppigheder anvendes. Arcsin-sqrt-transformation anvendes ved at tage invers sinus ($sin^{-1}$) af kvadratroden af ER.

50. I forbindelse med emergensforhold beregnes $EC_x$-værdier ved hjælp af regressionsanalyse (eller f.eks. probit (22), logit, Weibull, relevant software i handelen osv.). Hvis regressionsanalyse mislykkes (hvis der f.eks. er mindre end to delsvar), anvendes andre ikke-parametriske metoder, som f.eks. glidende gennemsnit eller simpel interpolation.

*Udviklingshastighed*

51. Den gennemsnitlige udviklingstid repræsenterer det gennemsnitlige tidsrum mellem tilsætningen af larver (testens dag 0) og emergensen af testkohorten af dansemyg. (Ved beregning af den sande udviklingstid tages larvernes alder på tilsætningstidspunktet i betragtning.) Udviklingshastigheden er det reciprokke tal til udviklingstiden (enhed: 1/dag) og angiver den del af larveudviklingen, der finder sted pr. dag. Udviklingshastigheden foretrækkes til evaluering af disse sedimenttoksicitetsforsøg, da dens varians er lavere, og da den er mere homogen og ligger tættere på normalfordelingen end udviklingstid. Testfremgangsmåder baseret på anvendelige parametre kan derfor bruges med udviklingshastighed i stedet for udviklingstid. For udviklingshastighed som et kontinuerligt respons kan $EC_x$-værdier estimeres ved hjælp af regressionsanalyse (f.eks. (23) (24)).

52. I forbindelse med følgende statistiske test antages det antal individer, der er observeret på kontroldagen, at være udviklet ved gennemsnittet af tidsintervallet mellem dag × og dag x-l (l = længde af inspektionsinterval, normalt 1 dag). Den gennemsnitlige udviklingshastighed pr. glas ($x$) beregnes ved hjælp af følgende ligning:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

hvor:

$\bar{x}$: gennemsnitlig udviklingshastighed pr. glas

i: indeks for inspektionsinterval

m: maksimalt antal inspektionsintervaller

▼M4

$f_i$: antal individer, der er udviklet i inspektionsintervallet i

$n_e$: det samlede antal individer, der er udviklet ved slutningen af forsøget (= $\sum f_i$)

$x_i$: udviklingshastighed for individer, der er udviklet i intervallet i

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

hvor:

$day_i$: inspektionsdag (siden behandling)

$l_i$: længde af inspektionsintervallet i (dage, normalt 1 dag)

**Testrapport**

53. Testrapporten skal mindst indeholde følgende oplysninger:

*Teststof:*

— fysiske egenskaber og relevante fysisk-kemiske egenskaber (vandopløselighed, damptryk, fordelingskoefficient i jord (eller sediment, hvis tilgængelig), stabilitet i vand osv.)

— kemisk identifikation (generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel osv.), herunder renhed og analysemetode til kvantificering af teststof.

*Testart:*

— anvendte forsøgsdyr: art, videnskabeligt navn, herkomst af organismer og dyrkningsbetingelser

— information om håndtering af ægmasser og larver

— forsøgsdyrenes alder ved tilsætning til testglas.

*Testbetingelser:*

— anvendt sediment, dvs. naturligt eller formuleret sediment

— for naturligt sediment: beliggenhed og beskrivelse af prøvetagningsstedet for sediment, herunder så vidt muligt oplysninger om tidligere forurening; karakteristika: pH, organisk kulstofindhold, C/N-forhold og kornstørrelse (hvis relevant)

— fremstilling af formuleret sediment: ingredienser og karakteristika (organisk kulstofindhold, pH, fugt osv. ved begyndelsen af testen)

— fremstilling af testvand (hvis rekonstitueret vand anvendes) og dets karakteristika (iltkoncentration, pH, ledningsevne, hårdhed osv. ved begyndelsen af testen)

— dybde af sediment og overliggende vand

— volumen af overliggende vand og porevand; vægt af vådt sediment med og uden porevand

— testglas (materiale og størrelse)

— metode til fremstilling af stamopløsninger og testkoncentrationer

▼M4

— anvendelse af teststof: anvendte testkoncentrationer, antal replikater og brug af evt. opløsningsmiddel

— inkubationsbetingelser: temperatur, lysintensitet og -periodicitet, beluftning (hyppighed og intensitet)

— detaljerede oplysninger om fodring, herunder fodertype, tilberedning, mængde og fodringshyppighed.

*Resultater:*

— nominelle testkoncentrationer, målte testkoncentrationer og resultater af alle analyser med henblik på at bestemme teststofkoncentrationen i testglasset

— kvaliteten af vandet i testglassene, dvs. pH, temperatur, opløst ilt, hårdhed og ammoniak

— evt. udskiftning af fordampet vand

— antal udviklede han- og hunindivider pr. glas og pr. dag

— antal larver, der ikke udviklede sig til dansemyg, pr. glas

— individuel gennemsnitlige tørvægt af larver pr. glas og pr. stadium, hvis relevant

— procentvis emergens pr. replikat og testkoncentration (samlet for han- og hunindivider)

— gennemsnitlig udviklingshastighed for fuldt udviklede individer pr. replikat og behandlingshastighed (samlet for han- og hunindivider)

— estimater for toksicitetseffektparametre, f.eks. $EC_x$ (og tilhørende konfidensintervaller), NOEC og/eller LOEC og de statistiske metoder, der anvendt til at beregne dem

— diskussion af resultaterne, herunder den eventuelle betydning af fravigelser fra denne testmetode.

*LITTERATUR:*

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R et al. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Endelig rapport til Europa-Kommissionen. Rapport nr. EC 3738. August 1994. WRc, Det Forenede Kongerige.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Fra WOSTA-workshop afholdt i Nederlandene.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125-1241. I ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼**M4**

(7) US-EPA/OPPTS 850,1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ og Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(15) Suedel BC og Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C og Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK og Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce og Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

I forbindelse med denne testmetode anvendes følgende definitioner:

**Formuleret sediment** eller rekonstitueret, kunstigt eller syntetisk sediment: en blanding af materialer, der bruges til at efterligne de fysiske bestanddele i naturligt sediment.

**Overliggende vand**: det vand, der tilsættes over sedimentet i testglasset.

**Interstitielt vand** eller porevand: det vand, der optager pladsen mellem sediment og jordpartikler.

**Spiked vand** eller forurenet vand: vand, som teststoffet er tilsat.

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

*Tillæg 2*

**Anbefalinger vedrørende dyrkning af *Chironomus riparius***

1. Chironomus-larver kan holdes i krystallisationsskåle eller større beholdere. Fint kvartssand spredes i et tyndt lag på ca. 5-10 mm på bunden af skålen. Kiselgur (f.eks. Merck, Art 8117) er også et egnet substrat (et tyndere lag på få mm er nok). En passende mængde vand tilsættes, så der fås en dybde på flere cm. Vandet fyldes op efter behov for at erstatte tab som følge af fordampning og undgå udtørring. Vandet kan udskiftes, hvis det er nødvendigt. Forsigtig beluftning skal foretages. Larvebeholderne opbevares i et bur, der er egnet til formålet, og som forhindrer udviklede voksne i at forsvinde. Buret skal være så stort, at udviklede voksne kan danne sværme. Ellers vil kopulation muligvis ikke forekomme (minimum er ca. 30 × 30 × 30 cm).

2. Burene opbevares ved rumtemperatur eller i rum med konstant temperatur ved 20 ± 2 °C med belysning, der består af 16 timers lys (intensitet ca. 1 000 lux) og 8 timers mørke. Det er rapporteret, at en luftfugtighed på mindre end 60 % RH kan hæmme reproduktionen.

**Fortyndingsvand**

3. Der kan anvendes egnet naturligt eller syntetisk vand. Brøndvand, afkloret ledningsvand eller kunstige medier (f.eks. Elendt M4 eller M7, se nedenfor) anvendes ofte. Vandet skal beluftes inden brug. Om nødvendigt kan vandet i beholderne udskiftes ved forsigtigt at hælde eller suge det brugte vand fra dyrkingsbeholderne uden at ødelægge larverørene.

**Fodring af larver**

4. Chironomus-larver fodres med fiskefoder i flager (Tetra Min®, Tetra Phyll® eller et tilsvarende mærke af særligt fiskefoder) med ca. 250 mg pr. beholder pr. dag. Foderet kan gives som tørt malet pulver eller som en suspension i vand: 1,0 g foder i flager tilsættes 20 ml fortyndet vand og blandes for at få en homogen blanding. Denne præparat kan tilsættes med ca. 5 ml pr. beholder pr. dag (rystes inden brug). Ældre larver kan gives mere foder.

5. Fodringen tilpasses vandkvaliteten. Hvis dyrkningsmediet bliver uklart, reduceres fodermængden. Tilsætningen af foder overvåges nøje. For lidt foder vil få larverne til at vandre til vandsøjlen, og for meget foder vil forårsage øget mikrobiel aktivitet og lavere iltkoncentrationer. Begge forhold kan medføre lavere vækstrater.

6. Nogle grønalger (f.eks. Scenedesmus subspicatus og Chlorella vulgaris) kan også tilsættes ved etableringen af nye dyrkningsbeholdere.

**Fodring af udviklede voksne**

7. Nogle forskere har foreslået, at vat, der er opblødt i mættet rørsukkeropløsning, kan bruges som foder til udviklede voksne.

▼M4

**Emergens**

8. Efter ca. 13-15 dage ved 20 ± 2 °C begynder voksne at udvikle sig fra larvebeholderne. Hanner kan nemt identificeres ved deres fjerbuskede antenner.

**Ægmasser**

9. Når der findes voksne i buret, skal alle larvebeholdere kontrolleres tre gange om ugen for afsætning af geleagtige ægmasser. Evt. ægmasser skal fjernes forsigtigt. De overføres til en lille plade med en prøve af dyrkningsvandet. Ægmasser bruges til at starte et nyt dyrkningsglas (f.eks. 2-4 ægmasser pr. glas) eller til toksicitetstest.

10. Æglarver udklækkes efter 2-3 dage.

**Etablering af nye dyrkningsglas**

11. Når vækstbetingelser er etableret, kan et nyt larvedyrkningsglas etableres hver uge eller mindre hyppigt afhængigt af testkravene, således at de ældste glas kan fjernes, når voksne individer har udviklet sig. Ved hjælp af dette system fås der er en regelmæssig forsyning af voksne med minimal håndtering.

**Fremstilling af testopløsninger M4 og M7**

12. Elendt (1990) har beskrevet M4-mediet. M7-mediet fremstilles på samme måde som M4-mediet bortset fra de stoffer, der er anført i tabel 1, for hvilke koncentrationerne er fire gange lavere i M7 end i M4. En artikel om M7-mediet er under forberedelse (Elendt, personlig meddelelse). I henhold til Elendt og Bias (1990) bør testopløsningen ikke fremstilles for de nævnte koncentrationer af $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ og $K_2HPO_4$, idet oplysningerne om fremstillingen af stamopløsninger ikke er fyldestgørende.

**Fremstilling af M7-mediet**

13. Hver stamopløsning (I) fremstilles individuelt, og en kombineret stamopløsning (II) fremstilles ud fra disse stamopløsninger (I) (se tabel 1). M7-mediet fremstilles ved at fortynde 50 ml af den kombinerede stamopløsning (II) og de mængder af hver stamopløsning med makro-næringsstoffer, der er anført i tabel 2, med 1 liter deioniseret vand. En vitaminopløsning fremstilles ved at tilsætte tre vitaminer til deioniseret vand som anført i tabel 3, og 0,1 ml af den kombinerede vitaminopløsning tilsættes det færdige M7-medium umiddelbart inden brug. Vitaminopløsningen opbevares i små aliquoter i frossen tilstand. Mediet beluftes og stabiliseres.

*Tabel 1*

**Stamopløsninger af sporstoffer til M4- og M7-medierne**

| Stamopløsninger (I) | Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand | Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand | | Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |

▼**M4**

| Stamopløsninger (I) | Mængde (mg), der fortyndes med 1 l deioniseret vand | Fremstilling af den kombinerede stamopløsning (II): Bland følgende mængder (ml) af stamopløsninger (I), og fortynd med 1 l deioniseret vand | | Endelige koncentrationer i testopløsninger (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| Kl | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Disse stoffer varierer i M4 og M7 som anført ovenfor.
(2) Disse opløsninger fremstilles hver for sig, hældes sammen og autoklaveres straks.

*Tabel 2*

**Stamopløsninger med makro-næringsstoffer til M4- og M7-medierne**

| | Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg) | Mængde af stamopløsninger med makro-næringsstoffer, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l) | Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Tabel 3*

**Vitaminopløsninger til M4- og M7-medierne**

Alle tre vitaminopløsninger samles for at fremstille én vitaminopløsning.

| | Mængde, der fortyndes med 1 l deioniseret vand (mg) | Mængde af vitaminopløsning, der tilsættes for at fremstille M4- og M7-medierne (ml/l) | Endelige koncentrationer i testopløsninger M4 og M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Thiaminhydrochlorid | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cyanocobalamin (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotin | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*LITTERATUR*

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Redigeret af M. Streloke og H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP og Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Tillæg 3*

FREMSTILLING AF FORMULERET SEDIMENT

**Sammensætning af sediment**

Det formulerede sediment skal have følgende sammensætning:

| Bestanddel | Karakteristika | % af sediment (tørvægt) |
|---|---|---|
| Tørv | Sphagnum så nær pH 5,5-6,0 som muligt uden synlige planterester og findelt (partikelstørrelse ≤ 1 mm) og lufttørret | 4-5 |
| Kvartssand | Kornstørrelse: > 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm | 75-76 |
| Kaolinholdigt ler | Kaolinindhold ≥ 30 % | 20 |
| Organisk kulstof | Justeres ved tilsætning af tørv og sand | 2 (± 0,5) |
| Calciumcarbonat | $CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent | 0,05-0,1 |
| Vand | Ledeevne ≤ 10 μS/cm | 30-50 |

**Fremstilling**

Tørven lufttørres og males til fint pulver. En suspension af den krævede mængde tørvepulver i ioniseret vand fremstilles ved brug af et højtydende homogeniseringsapparat. pH-værdien af denne suspension justeres til 5,5 ± 0,5 med $CaCO_3$. Suspensionen konditioneres i mindst to dage med forsigtig omrøring ved 20 ± 2 °C for at stabilisere pH og opnå en stabil mikrobiel komponent. pH måles igen og skal være 6,0 ± 0,5. Derefter blandes tørvesuspensionen med de andre bestanddele (sand og kaolinholdigt ler) og deioniseret vand for at få et homogent sediment med et vandindhold på 30-50 % af sedimentets tørvægt. Den færdige blandings pH måles igen og justeres om nødvendigt til 6,5 til 7,5 med $CaCO_3$. Der udtages prøver af sedimentet for at bestemme tørvægten og det organiske kulstofindhold. Inden det formulerede sediment anvendes i en toksicitetstest på chironomider, bør det konditioneres i syv dage under de betingelser, der anvendes i den efterfølgende test.

**Opbevaring**

De tørre bestanddele til fremstilling af kunstigt sediment lagres tørt og køligt ved rumtemperatur. Det formulerede (våde) sediment må ikke opbevares inden brug. Det skal bruges umiddelbart efter konditioneringsperioden på de syv dage, som afslutter dets fremstilling.

*LITTERATUR:*

Kapitel C.8 i dette bilag. Toksicitet for regnorme.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

*Tillæg 4*

**Kemiske egenskaber af acceptabelt vand til fortynding**

| Stof | Koncentrationer |
|---|---|
| Faste stoffer | < 20 mg/l |
| Totalt organisk kulstof | < 2 mg/l |
| Ikke-ioniseret ammoniak | < 1 µg/l |
| Hårdhed som $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Residualt chlor | < 10 µg/l |
| Total organiske phosphorpesticider | < 50 ng/l |
| Total chlorerede organiske pesticider + polychlorbiphenyler | < 50 ng/l |
| Total organisk chlor | < 25 ng/l |

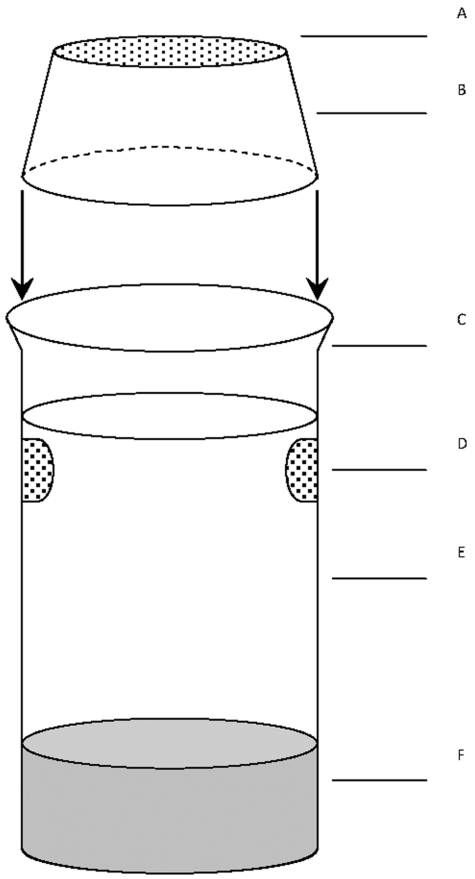
(*) Hvis der er formodning om en interaktion mellem hårdhedsioner og teststoffet, anvendes vand med lavere hårdhed (og dermed må Elendt-medium M4 ikke anvendes i denne situation).

▼M4

*Tillæg 5*

**Vejledning i overvågning af emergens af chironomidlarver**

Emergensfiltre anbringes på testbægerglassene. Disse filtre skal bruges fra dag 20 til slutningen af testen. Et eksempel på et filter vises nedenfor:




A: Nylonvæv

B: Omvendte plastbægre

C: Eksponeringsbæger uden flange

D: Åbninger med væv til vandudskiftning

E: Vand

F: Sediment

▼M4

## C.29. LET BIONEDBRYDELIGHED — $CO_2$ I LUKKEDE BEHOLDERE (HEADSPACE-TEST)

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 310 (2006). Denne testmetode er en screeningsmetode til evaluering af kemikaliers lette bionedbrydelighed og giver oplysninger, der svarer de oplysninger, der fås med de seks testmetoder, som er beskrevet i kapitel C.4 (A-F) i dette bilag. Et kemikalie, der giver positive resultater i forbindelse med denne testmetode, kan derfor betragtes som let bionedbrydeligt og derfor hurtigt nedbrydeligt i miljøet.

2. Den veletablerede kuldioxidmetode ($CO_2$) (1), der er baseret på Sturms originale test (2) til vurdering af organiske kemikaliers bionedbrydelighed, som måler den kuldioxid, der produceres ved mikrobiel aktivitet, har normalt været den foretrukne metode i forbindelse med test af tungtopløselige kemikalier og stærkt adsorberende kemikalier. Den er også blevet anvendt i forbindelse med opløselige (men ikke flygtige) kemikalier, da udviklingen af kuldioxid af mange betragtes som det eneste klare bevis for mikrobiel aktivitet. Eliminering af opløst organisk kulstof kan opnås ved hjælp af fysisk-kemiske processer — adsorption, fordampning, udfældning, hydrolyse — og ved hjælp af mikrobiel aktivitet, og mange ikke-biologiske reaktioner forbruger ilt. $CO_2$ produceres i sjældne tilfælde abiotisk fra organiske kemikalier. I den originale og tilpassede Sturm-test (1) (2) elimineres $CO_2$ fra væskefasen til de absorberende kar som følge »sparging« (dvs. luftbobler, der er behandlet til at eliminere $CO_2$ via det flydende substrat), mens $CO_2$ i Larsons version (3) (4) overføres fra reaktionsbeholderen til absorberne ved at lade $CO_2$-fri luft passere gennem headspace og ved også kontinuerligt at ryste testbeholderen. Kun i Larsons version rystes reaktionsbeholderen. Omrystning foreskrives kun for uopløselige stoffer i ISO 9439 (5) og i den originale amerikanske version (6), som begge foreskriver sparging i stedet for headspace-udskiftning. I en anden officiel amerikansk EPA-metode (7), som er baseret på Gledhills metode (8), er den omrystede reaktionsbeholder lukket for atmosfæren, og det producerede $CO_2$ opsamles i et indbygget alkalisk filter direkte fra gasfasen som i klassiske Warburg/Barcroft-respirometerkolber.

3. Det er påvist, at uorganisk kulstof akkumuleres i mediet ved anvendelse af den traditionelle tilpassede Sturm-test på en række kemikalier (9). En koncentration af uorganisk kulstof på så meget som 8 mg/l blev fundet under nedbrydningen af 20 mg C/l anilin. Opsamling af $CO_2$ i alkalifiltre gav derfor ikke et sandt billede af den mængde $CO_2$, der produceres mikrobiologisk på forskellige tidspunkter i løbet af nedbrydningen. Som følge deraf opfyldes forskriften om, at en teoretisk maksimal $CO_2$-produktion > 60 % skal opsamles inden for et »10-dages-vindue« (de 10 dage umiddelbart efter opnåelsen af 10 % bionedbrydning), for at et testkemikalie kan klassificeres som let bionedbrydeligt, ikke for visse kemikalier, der klassificeres som sådan ved hjælp af eliminering af opløst organisk kulstof (DOC).

4. Når den procentvise nedbrydning er en lavere værdi end forventet, akkumuleres uorganisk kulstof muligvis i testopløsningen. Bionedbrydelighed kan derefter vurderes med andre test for let bionedbrydelighed.

▼M4

5. På grund af andre ulemper ved Sturm-metoden (besværlig, tidskrævende, mere udsat for forsøgsfejl og ikke-anvendelig i forbindelse med flygtige kemikalier) har man tidligere forsøgt at finde en teknik med en lukket beholder — ud over Gledhills — i stedet for gasgennemstrømning (10) (11). Boatman et al. (12) gennemgik de tidligere metoder og anvendte et indesluttet headspace-system, hvor $CO_2$ blev frigivet til headspace ved slutningen af inkubationen gennem forsuring af mediet. $CO_2$ blev målt ved hjælp af gaskromatografi (GC)/analyse af uorganisk kulstof i automatisk udtagne prøver fra headspace, men opløst uorganisk kulstof (DIC) i væskefasen blev ikke taget i betragtning. De anvendte beholdere var desuden meget små (20 ml) og indeholdt kun 10 ml medium, hvilket gav problemer f.eks. ved tilsætning af de nødvendigvis meget små mængder uopløselige testkemikalier. Der kunne også være for få eller ingen mikroorganismer til stede i det inokulerede medium, som kan nedbryde testkemikalierne.

6. Disse vanskeligheder er blevet afhjulpet af de forsøg, som Struijs og Stoltenkamp (13) samt Birch og Fletcher (14) hver for sig har udført, idet sidstnævnte har været inspireret af erfaringer med apparatur anvendt i den anaerobe bionedbrydningstest (15). I den førstnævnte metode (13) måles $CO_2$ i headspace efter forsuring og ækvilibrering, mens DIC i sidstnævnte metode (14) måles i både gasfasen og væskefasen uden behandling. Over 90 % af det dannede uorganiske kulstof var til stede i væskefasen. Begge metoder har fordele i forhold til Sturm-testen, idet testsystemet var mere kompakt og håndterbart, flygtige kemikalier kan testes, og muligheden for forsinkelse i målingen af det producerede $CO_2$ undgås.

7. De to metoder blev kombineret i ISO Headspace $CO_2$-standarden (16), som blev ringtestet (17), og det er denne standard, der er grundlaget for denne testmetode. De to metoder er ligeledes blevet anvendt i den amerikanske EPA-metode (18). Der anbefales to metoder til måling af $CO_2$, nemlig $CO_2$ i headspace efter forsuring (13) og uorganisk kulstof i væskefasen efter tilsætning af yderligere alkali. Sidstnævnte metode blev introduceret af Peterson under CONCAWE-ringtesten (19) af denne headspace-metode med tilpasning til måling af iboende bionedbrydelighed. De ændringer, der blev foretaget i revisionen af metoderne i kapitel C.4 Bestemmelse af let bionedbrydelighed i dette bilag i 1992 (20), er indarbejdet i denne testmetode, således at betingelserne (medium, varighed osv.) i øvrigt er de samme som i den reviderede Sturm-test (20). Birch og Fletcher (14) har påvist, at næsten samme resultater blev opnået med denne headspace-test som med de samme kemikalier i OECD-ringtesten (21) af de reviderede testmetoder.

TESTENS PRINCIP

8. Som eneste kulstof- og energikilde inkuberes testkemikaliet, normalt ved 20 mg C/l, i et medium af bufrede mineralsalte, som er inokuleret med en blandet population af mikroorganismer. Testen udføres i lukkede flasker med headspace af luft, som skaber et iltreservoir til aerob bionedbrydning. $CO_2$-udviklingen som følge af den fuldstændige aerobe bionedbrydning af testkemikaliet bestemmes ved at måle det uorganiske kulstof, der produceres i testflaskerne, ud over det, der produceres i blindprøver, som kun indeholder inokuleret medium. Graden af bionedbrydning udtrykkes som en procentdel af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThIC) baseret på den mængde testkemikalie (som organisk kulstof), der oprindeligt blev tilsat.

9. DOC-eliminering og/eller graden af primær bionedbrydning af testkemikaliet kan også måles (20).

▼M4

OPLYSNINGER OM TESTKEMIKALIET

10. Testkemikaliets organiske kulstofindhold (% w/w) skal kendes enten fra dets kemiske struktur eller ved måling, således at den procentvise nedbrydning kan beregnes. For flygtige testkemikalier kan en målt eller beregnet Henrys konstant bruges til at bestemme et hensigtsmæssigt forhold mellem headspace og væskevolumen. Information om testkemikaliets toksicitet over for mikroorganismer kan bruges til at vælge en hensigtsmæssig testkoncentration og fortolke resultater, der påviser lav bionedbrydelighed. Kontrol for hæmning bør medtages, medmindre det er påvist, at testkemikaliet ikke hæmmer mikrobielle aktiviteter (se afsnit 24).

METODENS ANVENDELSESOMRÅDE

11. Testen kan anvendes i forbindelse med vandopløselige og uopløselige testkemikalier, men god dispergering af testkemikaliet skal sikres. Ved hjælp af det anbefalede forhold mellem headspace og væskevolumen på 1:2 kan flygtige kemikalier med en Henrys konstant på op til 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ testes, da testkemikaliets andel af headspace ikke overstiger 1 % (13). Et mindre headspace-volumen kan anvendes ved test af kemikalier, der er mere flygtige, men hvis biotilgængelighed virker begrænsende, navnlig hvis de er tungtopløselige i vand. Brugerne skal dog sikre, at forholdet mellem headspace og væskevolumen og koncentrationen af testkemikaliet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig aerob bionedbrydning. Det skal f.eks. undgås at bruge en høj substratkoncentration og et lille headspace-volumen. Vejledning i dette findes i (13) (23).

REFERENCEKEMIKALIER

12. For at kontrollere testfremgangsmåden testes et referencekemikalie med kendt bionedbrydelighed parallelt. Til det formål kan anilin, natriumbenzoat eller ethylenglycol anvendes i forbindelse med test af vandopløselige testkemikalier og 1-octanol til tungtopløselige testkemikalier (13). Bionedbrydning af disse kemikalier skal nå op på > 60 % af den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof inden for 14 dage.

REPRODUCERBARHED

13. I ISO-ringtesten af metoden (17) blev følgende resultater opnået under de anbefalede betingelser, herunder 20 mg C testkemikalie pr. liter.

| Testkemikalie | Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d) | Variationskoefficient (%) | Antal laboratorier |
|---|---|---|---|
| Anilin | 90 | 16 | 17 |
| 1-octanol | 85 | 12 | 14 |

Variabiliteten inden for testen (replikabilitet), ved brug af anilin, var lav, idet variationskoefficienterne var mindre end 5 % i næsten alle testserier. I de to tilfælde, hvor replikabiliteten var ringere, skyldtes den større variabilitet sandsynligvis en høj produktion af uorganisk kulstof i blindprøverne. Replikabiliteten var ringere med 1-octanol, men stadig mindre end 10 % for 79 % af testserierne. Denne større variabilitet inden for testen kan skyldes doseringsfejl, da en lille mængde (3-4 µl) 1-octanol skulle injiceres i lukkede testflasker. Der opnås højere variationskoefficienter, når der anvendes lavere koncentrationer af testkemikaliet, især ved koncentrationer under 10 mg C/l. Dette kan delvist afhjælpes ved at reducere koncentration af det totale kulstofindhold i inokulum.

▼M4

14. I en EU-ringtest (24) af fem overfladeaktive stoffer, som blev tilsat med 10 mg C/l, blev der opnået følgende resultater:

| Testkemikalie | Gennemsnitlig bionedbrydning i % (28 d) | Variationskoefficient (%) | Antal laboratorier |
|---|---|---|---|
| Tetrapropylen benzensulfonat | 17 | 45 | 10 |
| Di-isooctylsulfosuccinat (anionisk) | 72 | 22 | 9 |
| Hexadecyl-trimethyl- (*) ammoniumchlorid (kationisk) | 75 | 13 | 10 |
| Isononylphenol-(ethoxylat)$_9$ (nonionisk) | 41 | 32 | 10 |
| Coco-amid-propyl-dimethylhydroxy-sulfobetain (amfoter) | 60 | 23 | 11 |

(*) $SiO_2$ blev tilsat for at neutralisere toksicitet.

I henhold til resultaterne var variabiliteten generelt højere for de mindre velnedbrudte overfladeaktive stoffer. Variabiliteten inden for testen var mindre end 15 % for over 90 % af tilfældene, og den højeste nåede op på 30-40 %.

BEMÆRK: De fleste overfladeaktive stoffer er ikke enkeltmolekyler, men er blandinger af isomerer, homologer osv., der nedbrydes efter forskellige karakteristiske lag-perioder og ved forskellige kinetiske hastigheder, så der fås »uklare« kurver, som betyder, at pass-værdien på 60 % måske ikke nås inden for 10-dages-vinduet, selv om hvert molekyle når op på > 60 % inden for 10 dage, hvis det testes alene. Dette kan også observeres i forbindelse med andre komplekse blandinger.

BESKRIVELSE AF METODEN

*Apparatur*

15. Sædvanligt laboratorieudstyr og:

a) Glasserumflasker, lukket med propper af butylgummi og »crimp-on« aluminiumslåg. Den anbefalede størrelse er »125 ml«, som har et samlet volumen på ca. 160 ml. Volumen for hver flaske skal være angivet til 160 ± 1 ml. En mindre beholder kan bruges, hvis resultaterne opfylder betingelserne i afsnit 66 og 67.

b) Kulstofanalysator eller andet instrument (f.eks. gaskromatograf) til måling af uorganisk kulstof.

▼M4

c) Sprøjter med høj præcision til gasformige og flydende prøver.

d) Orbitalryster i temperaturreguleret miljø.

e) Tilførsel af $CO_2$-fri luft — dette kan fremstilles ved at lade luft passere gennem natriumhydroxidperler eller ved hjælp af en gasblanding af 80 % $N_2$/20 % $0_2$ (valgfrit) (se afsnit 28).

f) Membranfiltreringsapparatur med porøsitet på 0,20-0,45 μm (valgfrit).

g) Organisk kulstofanalysator (valgfri).

*Reagenser*

16. Anvend reagenser af analysekvalitet i hele testen.

*Vand*

17. Der anvendes destilleret eller deioniseret vand med ≤ 1 mg/l samlet organisk kulstof. Det repræsenterer ≤ 5 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført ved den anbefalede dosis af testkemikaliet.

*Stamopløsninger til medium med mineralsalte*

18. Stamopløsningerne og mediet af mineralsalte ligner dem, der anvendes i ISO 14593 (16) og testen for let bionedbrydelighed i kapitel C.4 i dette bilag (20). Der bør kun undtagelsesvis anvendes en højere koncentration af ammoniumchlorid (2,0 g/l i stedet for 0,5 g/l), f.eks. når koncentrationen af testkemikaliet er > 40 mg C/l. Stamopløsninger opbevares i køleskab og kasseres efter seks måneder eller tidligere, hvis der er tegn på udfældning eller mikrobiel vækst. Følgende stamopløsninger fremstilles:

a) Kaliumdihydrogenfosfat ($KH_2PO_4$) 8,50 g

Dikaliumhydrogenfosfat ($K_2HPO_4$) 21,75 g

Dinatriumhydrogenfosfatdihydrat ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Ammoniumchlorid ($NH_4Cl$) 0,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Denne opløsnings pH skal være 7,4 (± 0,2). Hvis det ikke opnås, fremstilles en ny opløsning.

b) Calciumchloriddihydrat ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

c) Magnesiumsulfatheptahydrat ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter.

d) Jern(III)chloridhexahydrat ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Opløses i vand og fortyndes til 1 liter. Tilsæt en dråbe koncentreret HCl.

*Fremstilling af mineralsk medium*

19. 10 ml af opløsning a) blandes med ca. 800 ml vand (afsnit 17), og af opløsning b), c) og d) tilsættes der 1 ml af hver, hvorefter der fyldes op til 1 liter med fortyndingsvand (afsnit 17).

*Andre reagenser*

20. Koncentreret orthophosphorsyre ($H_3PO_4$) (> 85 % masse pr. volumenenhed).

▼M4

*7 M natriumhydroxidopløsning*

21. 280 g natriumhydroxid (NaOH) opløses i 1 liter vand (afsnit 17). Bestem koncentrationen af opløst uorganisk kulstof (DIC) i denne opløsning, og anvend denne værdi ved beregningen af testresultatet (se afsnit 55 og 61), især på baggrund af validitetskriteriet i afsnit 66, litra b). Fremstil en frisk opløsning, hvis DIC-koncentrationen er for høj.

*Testkemikalie*

22. Fremstil en stamopløsning af et tilstrækkeligt vandopløseligt testkemikalie i vand (afsnit 17) eller i testmediet (afsnit 19) ved en koncentration, der helst er 100 gange højere end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen. Det kan være nødvendigt at justere stamopløsningens pH. Stamopløsningen tilsættes det mineralske medium for at opnå en endelig koncentration for organisk kulstof på 2-40 mg C/l, helst 20 mg C/l. Hvis der anvendes lavere koncentrationer end disse, kan det påvirke den opnåede præcision. Opløselige og uopløselige flydende kemikalier kan tilsættes beholderne direkte ved hjælp af højpræcisionssprøjter. Lavt opløselige og uopløselige testkemikalier kan kræve særlig behandling (25). Der findes følgende valgmuligheder:

a) direkte tilsætning af kendte vejede mængder

b) ultralydsdispergering inden tilsætning

c) dispergering med hjælp fra emulgeringsmidler, hvor det dog fastlægges, om de har hæmmende eller stimulerende virkning på den mikrobielle aktivitet, inden tilsætning

d) adsorption af flydende testkemikalier eller en opløsning i et egnet flygtigt opløsningsmiddel til et inert medium eller underlag (f.eks. glasfiberfilter) efterfulgt af fordampning af det anvendte opløsningsmiddel og direkte tilsætning af kendte mængder

e) tilsætning af et kendt volumen af en opløsning af testkemikaliet i et meget flygtigt opløsningsmiddel til en tom testbeholder efterfulgt af fordampning af opløsningsmidlet.

Stoffer eller opløsningsmidler, der er anvendt i c), d) og e) skal testes for evt. stimulerende eller hæmmende virkning på den mikrobielle aktivitet (se afsnit 42, litra b)).

*Referencekemikalie*

23. Fremstil en stamopløsning af det opløselige referencekemikalie i vand (afsnit 17) ved en koncentration, der helst er 100 gange større end den slutkoncentration, der skal anvendes i testen (20 mg C/l).

*Test for hæmning*

24. Testkemikalier udviser ofte ingen signifikant nedbrydning under de betingelser, der anvendes i forbindelse med vurderinger af let bionedbrydelighed. Det kan skyldes, at testkemikaliet har hæmmende virkning på inokulum ved den koncentration, som det anvendes med i testen. En test for hæmning kan indgå i testdesignet for at gøre det lettere (efterfølgende) at udpege hæmning som en mulig årsag eller medvirkende faktor. Alternativt kan testen for hæmning udelukke en sådan påvirkning og vise, at ingen eller kun let nedbrydning kan tilskrives manglende mulighed for mikrobielt angreb under de anvendte testbetingelser. For at få oplysninger om testkemikaliets toksicitet for (aerobe) mikroorganismer fremstilles en opløsning af testmediet, der indeholder testkemikaliet og referencekemikaliet (afsnit 19) ved de koncentrationer, som de er tilsat ved (se afsnit 22 og 23).

▼M4

*Inokulum*

25. Inokulum kan stamme fra en række forskellige kilder: aktiveret slam, spildevandsafløb (ikke-chlorerede), overfladevand og -jord eller en blanding af disse (20). Kildens biologiske nedbrydningsaktivitet skal kontrolleres ved hjælp af et referencekemikalie. Uanset kilden må mikroorganismer, der tidligere er eksponeret for testkemikaliet, ikke anvendes, hvis fremgangsmåden skal bruges som en test for let bionedbrydelighed.

Advarsel: Aktiveret slam, spildevand og spildevandsafløb kan indeholde patogene organismer og skal håndteres med forsigtighed.

26. Erfaringer har vist, at det optimale volumen for inokulum er det volumen, som:

— er tilstrækkeligt til at skabe den nødvendige bionedbrydende aktivitet

— nedbryder referencekemikaliet med den angivne procentdel (se afsnit 66)

— giver $10^2$ til $10^5$ kolonidannende enheder pr. ml endelig blanding

— normalt giver en koncentration på 4 mg/l suspenderede stoffer i den endelige blanding, når aktiveret slam anvendes; koncentrationer på op til 30 mg/l kan anvendes, men kan forøge blindprøvernes $CO_2$-produktion markant (26)

— bidrager med under 10 % af det indledende organiske kulstofindhold tilført af testkemikaliet

— generelt udgør 1-10 ml af inokulum til 1 liter testopløsning.

*Aktiveret slam*

27. Aktiveret slam udtages frisk fra beluftningstanken ved et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der fortrinsvis behandler husholdningsspildevand. Om nødvendigt fjernes grove partikler ved sigtning (f.eks. ved hjælp af en sigte med et net på 1 $mm^2$), og slammet opbevares aerobisk indtil anvendelsen.

28. Alternativt kan slammet henstå til bundfældning eller centrifugeres (f.eks. ved 1 100 × g i 10 min), efter at grove partikler er fjernet. Supernatanten kasseres. Slammet kan vaskes i den mineralske opløsning. Det koncentrerede slam suspenderes til en koncentration på 3-5 g suspenderede stoffer pr. liter, hvorefter det beluftes indtil anvendelse.

29. Slammet skal tages fra et velfungerende konventionelt rensningsanlæg. Slammet vaskes, hvis det er nødvendigt at tage det fra et stærkt belastet rensningsanlæg, eller et rensningsanlæg, som menes at indeholde hæmmende stoffer. Det resuspenderede slam henstår til bundfældning eller centrifugeres efter grundig blanding, supernatanten fjernes, og det vaskede slam resuspenderes i mineralsk medium. Denne fremgangsmåde gentages, indtil slammet menes at være fri for overskud af substrat eller hæmmende stoffer.

30. Lige før brugen udtages der en prøve af det fuldstændigt resuspenderede slam eller af det ubehandlede slam med henblik på at bestemme mængden af suspenderede stoffer.

31. Et andet alternativ er at homogenisere aktiveret slam (3-5 g suspenderede stoffer pr. liter). Slammet behandles i en Waring-blender i 2 minutter ved middel hastighed. Det homogeniserede slam henstår til bundfældning i mindst 30 minutter, og væsken dekanteres fra til brug som inokulum i en mængde på 10 ml pr. liter mineralsk medium.

▼M4

32. Yderligere reduktion af den blinde $CO_2$-udvikling kan opnås ved at belufte slammet natten over med $CO_2$-fri luft. Brug 4 mg/l aktiverede slamfaststoffer som inokulumkoncentration i denne test (13).

*Sekundært spildevand*

33. Inokulum kan også fremstilles af sekundært udløb fra et rensningsanlæg eller et laboratorieanlæg, der overvejende behandler husholdningsspildevand. Prøven opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis det ikke er muligt, skal den prækonditioneres. Udløbet filtreres gennem et groft filter for at fjerne grove partikler, og pH-værdien måles.

34. For at reducere indholdet af uorganisk kulstof tilføres filtratet $CO_2$-fri luft (»såkaldt sparging«) (afsnit 15, litra e)), i 1 time, mens pH-værdien holdes på 6,5 ved hjælp af orthophosphorsyre (afsnit 20). pH-værdien genoprettes til den oprindelige værdi ved hjælp af natriumhydroxid (afsnit 21), og efter bundfældning i ca. 1 time udtages en passende mængde supernatant til inokulering. Denne »sparging« reducerer indholdet af uorganisk kulstof i inokulum. Når den anbefalede maksimumsmængde af filtreret »sparget« udløb (100 ml) pr. liter blev anvendt som inokulum, var mængden af uorganisk kulstof i blindkontrollerne i intervallet 0,4 til 1,3 mg/l (14), hvilket repræsenterede 2-6,5 % af testkemikaliet C ved 20 mg C/l og 4-13 % ved 10 mg C/l.

*Overfladevand*

35. En prøve udtages af egnet overfladevand. Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Prøven koncentreres om nødvendigt ved filtrering eller centrifugering. Den mængde inokulum, der skal anvendes i hver testbeholder, skal opfylde kriterierne i afsnit 26.

*Jord*

36. En prøve udtages af egnet jord i en dybde på op til 20 cm under jordoverfladen. Sten, planterester og hvirvelløse dyr fjernes fra jordprøven, inden den sigtes gennem et 2 mm net (hvis prøven er for våd til sigtning, lufttørres den inden sigtning). Den opbevares under aerobe betingelser og anvendes på indsamlingsdagen. Hvis prøven transporteres i en løst bundet sort plastpose, kan den opbevares i posen ved 2-4 °C i op til en måned).

*Prækonditionering af inokulum*

37. Inokulum kan prækonditioneres til forsøgsbetingelserne, men må ikke tilvænnes til testkemikaliet. Prækonditionering kan reducere den blinde $CO_2$-udvikling. Prækonditioneringen består i beluftning af aktiveret slam efter fortynding i testmediet til 30 mg/l med fugtig $CO_2$-fri luft i op til 5-7 dage ved testtemperatur.

TESTPROCEDURE

*Antal flasker*

38. Det antal flasker (afsnit 15, litra a)), der skal bruges til en test, afhænger af analysehyppigheden og testvarigheden.

39. Det anbefales, at et tredobbelt antal flasker analyseres efter et tilstrækkeligt antal tidsintervaller, således at 10-dages-vinduet kan påvises. Mindst fem testflasker (afsnit 15, litra a)) fra sæt a), b) og c) (se afsnit 42) analyseres ved testens afslutning for at gøre det muligt at beregne 95 %-konfidensintervallet for den gennemsnitlige bionedbrydning i procent.

▼M4

*Medium med inokulum*

40. Inokulum bruges ved en koncentration på 4 mg/l aktiveret slam med faststoffer. Umiddelbart inden anvendelse fremstilles en tilstrækkelig mængde inokuleret medium ved f.eks. at tilsætte 2 ml korrekt behandlet aktiveret slam (afsnit 27-32) ved 2 000 mg/l til 1 liter medium med mineralsalte (afsnit 19). Når sekundært spildevandsudløb bruges, tilsættes op til 100 ml udløb (afsnit 33) til 900 ml medium med mineralsalte (afsnit 19), som fortyndes til 1 liter med medium.

*Klargøring af flasker*

41. Prøver af inokuleret medium dispenseres til replikatflasker, så der fås et forhold mellem headspace og væske på 1:2 (tilsæt f.eks. 107 ml til flasker med en kapacitet på 160 ml). Andre forhold kan anvendes, men se advarslen i afsnit 11. Uanset den anvendte type inokulum skal det sikres, at det inokulerede medium blandes tilstrækkeligt, så det fordeles ensartet til testflaskerne.

42. Sæt af flasker (afsnit 15, litra a)) klargøres til at indeholde følgende:

a) testbeholdere (benævnt som $F_T$), som indeholder testkemikaliet

b) blindkontroller (benævnt $F_B$), som kun indeholder testmediet plus inokulum; evt. kemikalier, opløsningsmidler, stoffer eller glasfiberfiltre, der anvendes til at tilsætte testkemikaliet til testbeholderen, skal også tilsættes

c) beholdere (benævnt $F_C$) med referencekemikaliet til at kontrollere fremgangsmåden

d) om nødvendigt beholdere (benævnt $F_I$) til at kontrollere, om testkemikaliet virker hæmmende; der tilsættes både test- og referencekemikalie ved samme koncentration (afsnit 24) som i de andre flasker (henholdsvis $F_T$ og $F_C$)

e) beholdere (benævnt $F_S$) til at kontrollere evt. abiotisk nedbrydning som a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ eller steriliseret på anden måde (f.eks. ved autoklavering).

43. Vandopløselige testkemikalier og referencekemikalier tilsættes som vandige stamopløsninger (afsnit 22, 23 og 24), så der fås en koncentration på 10 til 20 mg C/l.

44. Uopløselige testkemikalier og uopløselige referencekemikalier hældes på flasker på forskellige måder (se afsnit 22, litra a-e)) afhængigt af kemikaliets karakter enten før eller efter tilsætningen af mediet med inokulum og afhængigt af metoden til behandling af testkemikaliet. Hvis en af de fremgangsmåder, der er beskrevet i afsnit 22, litra a-e), anvendes, behandles blindkontrollerne $F_B$ (afsnit 42, litra b)) på en lignende måde, men uden at tilsætte testkemikaliet eller referencekemikaliet.

45. Flygtige testkemikaliet injiceres i lukkede flasker (afsnit 47) ved brug af en mikrosprøjte. Dosis beregnes ud fra det injicerede volumen og testkemikaliets densitet.

46. Vand tilsættes beholdere efter behov for at opnå samme væskevolumen i hver beholder. Det skal sikres, at forholdet mellem headspace og væskevolumen (normalt 1:2) og koncentrationen af testkemikaliet er af en sådan karakter, at der er ilt nok til stede til at muliggøre fuldstændig bionedbrydning.

▼M4

47. Alle flasker lukkes derefter med f.eks. propper af butylgummi og aluminiumskapsler. Flygtige testkemikalier tilsættes på dette trin (afsnit 45). Hvis reduktionen i testopløsningens DOC-koncentration skal overvåges, og der skal udføres analyser fra nultid af den indledende koncentration af uorganisk kulstof (sterile kontroller, afsnit 42, litra e)) eller andre determinanter, udtages en passende prøve fra testbeholderen. Derefter kasseres testbeholderen med indhold.

48. De lukkede flasker anbringes på en orbitalryster (afsnit 15, litra d)), og der anvendes en rystehastighed, så flaskens indhold forbliver velblandet og suspenderet (f.eks. 150-200 rpm). Flaskernes inkuberes i mørke ved 20 °C (± 1 °C).

*Prøvetagning*

49. Prøvetagningsmønstret afhænger af lag-perioden og den kinetiske hastighed af testkemikaliets bionedbrydning. Flasker bruges til analyse på dagen for prøvetagning, som skal ske mindst ugentligt eller hyppigere (f.eks. to gange om ugen), hvis der kræves en fyldestgørende kurve for nedbrydning. Det krævede antal replikatflasker, herunder $F_T$, $F_B$ og $F_C$ samt evt. $F_I$ og $F_S$ (se afsnit 42), udtages fra rysteren. Testen forløber normalt over 28 dage. Hvis kurven for bionedbrydning indicerer, at der er opnået et plateau inden dag 28, kan testen afsluttes tidligere end efter 28 dage. Udtag prøver fra de fem flasker, der er reserveret til testens 28. dag, til analyse, og anvend resultaterne til at beregne konfidensintervallet eller variationskoefficienten for den procentvise bionedbrydning. Der skal ikke tages prøver af flasker, der anvendes til test for hæmning og abiotisk nedbrydning, så ofte som af de øvrige flasker. Dag 1 og dag 28 er nok.

*Analyse af uorganisk kulstof*

50. $CO_2$-produktionen i flasker bestemmes ved at måle stigningen i koncentrationen af uorganisk kulstof under inkubering. Der findes to anbefalede metoder til måling af den mængde uorganisk kulstof, der produceres i løbet af testen, og de er beskrevet nedenfor. Da metoderne kan give lidt forskellige resultater, bør den samme metode anvendes i hele testforløbet.

51. Metode a) anbefales, hvis mediet sandsynligvis indeholder rester af f.eks. glasfilterpapir og/eller uopløseligt testkemikalie. Denne analyse kan udføres ved hjælp af en gaskromatograf, hvis en kulstofanalysator ikke er til rådighed. Det er vigtigt, at flaskerne er ved eller tæt på testtemperaturen, når headspace-gassen analyseres. Metode b) kan være nemmere at anvende for laboratorier, der bruger en kulstofanalysator til at måle uorganisk kulstof. Det er vigtigt, at den natriumhydroxidopløsning (afsnit 21), der bruges til at omdanne $CO_2$ til karbonat, er friskfremstillet, eller at dens indhold af uorganisk kulstof er kendt, således at den kan tages i betragtning ved beregningen af testresultaterne (se afsnit 66, litra b)).

*Metode a): forsuring til pH < 3*

52. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof (f.eks. 1 % w/w $CO_2$ i $N_2$). Koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20) injiceres i låget på hver udtaget flaske for at reducere pH i mediet til < 3 (tilsæt f.eks. 1 ml til 107 ml testmedium). Flaskerne sættes tilbage på rysteren. Efter 1 times rysten ved testtemperaturen tages flaskerne af rysteren. Aliquoter (f.eks. 1 ml) af gas udtages fra headspace på hver flaske og overføres til kulstofanalysatoren. De målte koncentrationer af uorganisk kulstof registreres som mg C/l.

▼M4

53. Efter forsuring til pH < 3 og ækvilibrering ved 20 °C er ligevægtskonstanten for fordelingen af $CO_2$ mellem væske- og gasfasen i testflaskerne ved denne metode 1,0, når den måles som en koncentration (13). Dette påvises mindst én gang for et testsystem på følgende måde:

Klargør flasker med 5 og 10 mg/l som inaktivt kulstof ved hjælp af en opløsning af vandfrit natriumcarbonat ($Na_2CO_3$) i $CO_2$-frit vand klargjort ved forsuring af vand til pH 6,5 med koncentreret orthophosphorsyre (afsnit 20), sparging natten over med $CO_2$-fri luft og forøgelse af pH til neutralitet med alkali. Sørg for, at forholdet mellem headspace og væskevolumen er det samme som i testene (f.eks. 1:2). Foretag forsuring og ækvilibrering som beskrevet i afsnit 52, og mål koncentrationerne af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen. Kontroller, at de to koncentrationer er ens inden for margenen for forsøgsfejl. Hvis ikke, gennemgås fremgangsmåderne. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af fordelingen af uorganisk kulstof mellem væske- og gasfasen, hver gang testen udføres. Den bør udføres i forbindelse med kalibreringen.

54. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate (ikke-forsurede) flasker. De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

*Metode b): omdannelse af $CO_2$ til karbonat*

55. Inden hver analyseserie kalibreres kulstofanalysatoren ved hjælp af en hensigtsmæssig standard for uorganisk kulstof, f.eks. en opløsning af natriumbicarbonat ($NaHCO_3$) i $CO_2$-frit vand (se afsnit 53) i intervallet 0 til 20 mg/l som uorganisk kulstof. 7 M natriumhydroxidopløsning (afsnit 21) (f.eks. 1 ml til 107 ml medium) injiceres i låget på hver udtaget flaske, og flaskerne rystes i 1 time ved testtemperatur. Brug den samme NaOH-opløsning til alle flasker, der bruges på en bestemt dag, men ikke nødvendigvis til alle prøvetagninger i løbet af en test. Hvis der kræves absolutte blindværdier for uorganisk kulstof ved alle prøvetagninger, skal uorganisk kulstof i NaOH-opløsningen bestemmes, hver gang den anvendes. Flaskerne tages af rysteren og henstilles til bundfældning. Passende mængder (f.eks. 50 til 1 000 µl) af væskefasen i hver flaske udtages ved hjælp af en sprøjte. Prøverne overføres til kulstofanalysatoren, og koncentrationerne af uorganisk kulstof registreres. Det skal sikres, at analysatoren er udstyret til at håndtere alkaliske prøver, der er fremstillet ved hjælp af denne metode.

56. Efter tilsætning af alkali og omrysten er koncentrationen af uorganisk kulstof ved denne metode ubetydelig. For testsystemet bør dette kontrolleres mindst én gang ved hjælp af standarder for uorganisk kulstof, tilsætning af alkali og ækvilibrering samt måling af koncentrationen af uorganisk kulstof i både headspace- og væskefasen (se afsnit 53). Koncentrationen i headspace skal være nær nul. Det er ikke nødvendigt at udføre denne kontrol af næsten fuldstændig absorption af $CO_2$, hver gang testen udføres.

57. Hvis DOC-eliminering skal måles (kun vandopløselige testkemikalier), udtages prøver af væskefasen fra separate flasker (uden tilsat alkali). De filtreres gennem en membran og overføres til DOC-analysatoren. Disse flasker kan efter behov anvendes til andre analyser for at måle den primære bionedbrydning.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

**Beregning af resultater**

58. Hvis 100 % mineralisering af testkemikaliet til $CO_2$ antages, er den teoretiske maksimale produktion af uorganisk kulstof (ThIC) ud over det, der produceres i blindkontrollerne, lig med det opløste organiske kulstof (TOC), der tilsættes hver flaske ved begyndelsen af testen, dvs.:

$$ThIC = TOC$$

Den samlede masse (mg) af uorganisk kulstof (TIC) i hver flaske er:

$$\begin{aligned} TIC &= (\text{mg C i væske} + \text{mg C i headspace}) \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned} \qquad \text{Ligning [1]}$$

hvor:

$V_L$ = volumen af væske i flasken (liter)

$C_L$ = koncentration af organisk kulstof i væske (mg/l som kulstof)

$V_H$ = volumen af headspace (liter)

$C_H$ = koncentration af organisk kulstof i headspace (mg/l som kulstof).

Beregningerne af TIC til de to analysemetoder, der anvendes til måling af uorganisk kulstof i denne test, er beskrevet nedenfor i afsnit 60 og 61. Den procentvise bionedbrydning (*%D*) fås i hvert tilfælde ved:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \qquad \text{Ligning [2]}$$

hvor:

$TIC_t$ = mg TIC i testflaske på tidspunktet t

$TIC_b$ = gennemsnitlig mg TIC i blindflasker på tidspunktet t

TOC = mg TOC indledningsvis tilsat testbeholderen.

Den procentvise bionedbrydning %D beregnes for testflasken ($F_T$), referenceflasken ($F_C$) og evt. flasken til kontrol for hæmning ($F_I$) ud fra de respektive mængder TIC, der er produceret indtil prøvetagningstidspunktet.

59. Hvis der er sket en signifikant stigning i TIC-indholdet i de sterile kontroller ($F_S$) i løbet af testperioden, kan det konkluderes, at der er sket abiotisk nedbrydning af testkemikaliet, og at dette skal tages i betragtning i beregningen af D i ligning [2].

**Forsuring til pH < 3**

60. Eftersom forsuring til pH < 3 og ækvilibrering fører til udligning af koncentrationen af TIC i væske- og gasfasen, skal kun koncentrationen af organisk kulstof måles i gasfasen. I henhold til ligning [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, hvor $V_B$ = volumen i serumflaske.

**Omdannelse af $CO_2$ til karbonat**

61. I forbindelse med denne metode udføres beregningerne som i ligning [1], men den ubetydelige mængde af uorganisk kulstof i gasfasen ignoreres, dvs. $V_H \times C_H = 0$, og $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

**Angivelse af resultater**

62. En bionedbrydningskurve fås ved at afsætte den procentvise bionedbrydning, D, i forhold til inkubationstiden. Hvis det er muligt, angives lag-fasen, bionedbrydningsfasen, 10-dages-vinduet og plateau-fasen, dvs. den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig. Hvis sammenlignelige resultater opnås for parallelle testflasker $F_T$ (forskel på < 20 %), afsættes en gennemsnitlig kurve (se tillæg 2, figur 1); hvis ikke, afsættes kurver for hver flaske. Gennemsnitsværdien for den procentvise bionedbrydning i plateaufasen bestemmes, eller den højeste værdi vurderes (f.eks. når kurven falder i plateaufasen), men det er i sidstnævnte tilfælde vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi. Dette maksimale niveau af bionedbrydning angives som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliet« i testrapporten. Hvis antallet af testbeholdere var utilstrækkeligt til at indicere en plateaufase, anvendes de data, der er målt for den sidste testdag, til at beregne en gennemsnitlig værdi. Denne sidste værdi, gennemsnittet af fem replikater, bruges til at indicere den præcision, hvormed den procentvise bionedbrydning er bestemt. Endvidere rapporteres den værdi, der blev indhentet ved afslutningen af 10-dages-vinduet.

63. På samme måde afsættes der en kurve for referencekemikaliet, $F_C$, samt kontrollen for abiotisk eliminering, $F_S$, og kontrollen for hæmning, $F_I$, hvis de er medtaget.

64. De mængder af TIC, der er til stede i blindkontrollerne ($F_B$), registreres, og det samme gælder mængderne i $F_S$-flaskerne (abiotisk kontrol), hvis de er medtaget i testen.

65. Beregn D for $F_I$-flaskerne baseret på den teoretiske værdi for uorganisk kulstof, der fås fra blandingens referencekomponent alene. Hvis $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ % på dag 28, kan det antages, at testkemikaliet har hæmmet aktiviteten for inokulum, og at de lave værdier for $D_{FT}$, der blev opnået under testbetingelserne, kan tilskrives dette. I dette tilfælde gentages testen ved hjælp af en lavere testkoncentration og helst med reduktion af DIC i inokulum og TIC dannet i blindprøverne, da den lavere koncentration ellers vil reducere metodens præcision. Ellers kan der anvendes et andet inokulum. Hvis der i flasken $F_S$ (abiotisk) observeres en signifikant stigning (> 10 %) i mængden af TIC, kan abiotiske nedbrydningsprocesser være opstået.

**Resultaternes validitet**

66. En test anses for gyldig, hvis:

a) den gennemsnitlige procentvise nedbrydning i $F_C$-flasker, som indeholder referencekemikaliet, er > 60 % på den 14. inkubationsdag, og

b) den gennemsnitlige mængde af TIC i blindkontrollerne $F_B$ ved slutningen af testen er > 3 mg C/l.

Hvis disse grænser ikke overholdes, gentages testen med et inokulum fra en anden kilde, og/eller de anvendte fremgangsmåder kontrolleres. Hvis f.eks. en høj blindproduktion af uorganisk kulstof er et problem, følges fremgangsmåden i afsnit 27-32.

(1) Den procentvise nedbrydning i $F_C$-flasker med referencestoffet.
(2) Den procentvise nedbrydning i $F_I$-flasker.

▼M4

67. Hvis testkemikaliet ikke når op på 60 % ThIC, og det er påvist, at det ikke er hæmmende (afsnit 65), kan testen gentages med en højere inokulumkoncentration (op til 30 mg/l aktiveret slam og 100 ml udløb/l) eller inokulum fra andre kilder, navnlig hvis nedbrydning var i intervallet 20-60 %.

**Fortolkning af resultater**

68. Bionedbrydning > 60 % ThIC inden for 10-dages-vinduet i denne test viser, at testkemikaliet er let bionedbrydeligt under aerobe betingelser.

69. Hvis pass-værdien på 60 % ThIC ikke opnås, bestemmes pH-værdien i medier i flasker, der ikke er blevet forsuret eller alkaliske. En værdi på mindre end 6,5 kunne indicere, at nitrificering er forekommet. I det tilfælde gentages testen med en bufferopløsning med en højere koncentration.

**Testrapport**

70. Opstil en tabel over % D for hver testflaske ($F_T$), referenceflaske ($F_C$) og evt. flaske til kontrol for hæmning ($F_I$) for hver prøvetagningsdag. Hvis sammenlignelige resultater opnås for replikatflasker, afsættes en kurve over gennemsnitlig % D i forhold til tid. Registrer mængden af TIC i blindflasker ($F_B$) og i de sterile kontrolflasker ($F_S$) samt DOC og/eller andre determinanter og deres procentvise eliminering.

71. Bestem gennemsnitsværdien for % D i plateaufasen, eller anvend den højeste værdi, hvis kurven for bionedbrydning falder i plateaufasen, og rapporter dette som »graden af bionedbrydningen af testkemikaliet«. I sidstnævnte tilfælde er det vigtigt at kontrollere, at værdien ikke er en ekstrem værdi.

72. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— generisk navn, kemisk navn, CAS-nummer, strukturformel og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— renhed (urenheder) af teststoffet.

*Testbetingelser:*

— reference til denne testmetode

— beskrivelse af det anvendte testsystem (f.eks. beholderens volumen, forhold mellem headspace og væske, omrøringsmetode osv.)

— tilførsel af testkemikaliet og referencekemikaliet til testsystemet: anvendt testkoncentration, mængde af kulstof tilsat hver testflaske og anvendte opløsningsmidler

— detaljer om det anvendte inokulum, evt. forbehandling og prækonditionering

— inkubationstemperatur

— validering af princippet for analyse af uorganisk kulstof

— primære karakteristika for den anvendte kulstofanalysator (og andre anvendte analysemetoder)

— antal replikater.

*Resultater:*

— rådata og beregnede værdier for bionedbrydelighed opstillet i tabelform

▼M4

— afbildning af den procentvise nedbrydning i forhold til tid for test- og referencekemikalier med angivelse af lag-periode, nedbrydningsfase, 10-dages-vindue og hældning

— procentvis eliminering ved plateau, ved testens afslutning og efter 10-dages-vinduet

— årsager til evt. afvisning af testresultaterne

— andre fakta, der er relevante for den anvendte fremgangsmåde

— diskussion af resultater.

*LITTERATUR:*

(1) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed — $CO_2$-udvikling (metode C.4-C).

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA og Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revideret 1999). Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Carbon dioxide evolution Test (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I og Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM og Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH og Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL og Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J og Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR og Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, og Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Water Quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels ($C0_2$ headspace test).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR og Starkey M (1999). An »inherent« biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Kapitel C.4 i dette bilag, Bestemmelse af let bionedbrydelighed.

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) og Final report (M. Kitano og M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Kapitel C.11 i dette bilag, Biologisk nedbrydning — aktiveret slam — respirationshæmningstest.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ og Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace $CO_2$ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, Det Forenede Kongerige.

(25) ISO 10634 (1996) Water Quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

▼M4

*Tillæg 1*

FORKORTELSER OG DEFINITIONER

**IC:** uorganisk kulstof.

**$ThCO_2$:** teoretisk kuldioxid (mg) er den mængde kuldioxid, der ifølge beregninger på grundlag af testkemikaliets kendte eller målte kulstofindhold skulle dannes ved fuldstændig nedbrydning af testkemikaliet; den udtrykkes også i mg udviklet kuldioxid pr. mg testkemikalie.

**DOC:** opløst organisk kulstof er den mængde organisk kulstof, der er til stede i opløsning, passerer gennem et 0,45 μm filter eller forbliver i centrifugatet efter centrifugering ved 4 000 g (ca. 40 000 $ms^{-2}$) i 15 minutter.

**DIC:** opløst uorganisk kulstof.

**ThIC:** teoretisk uorganisk kulstof.

**TIC:** totalt uorganisk kulstof.

**Let bionedbrydelig:** en arbitrær klasse af kemikalier, der har bestået visse specifikke screeningstest for fuldstændig bionedbrydning; disse test er så krævende, at sådanne kemikalier i vandigt miljø under aerobe forhold hurtigt vil blive fuldstændigt nedbrudt.

**10-dages-vindue:** den periode på 10 dage, der begynder, når nedbrydningen er nået op på 10 %.

**Iboende bionedbrydelighed:** en klasse af kemikalier, som ved enhver bionedbrydelighedstest klart har vist sig at kunne omdannes ved bionedbrydning (primær eller fuldstændig).

**Endelig aerob bionedbrydning:** den nedbrydningsgrad, der er nået, når mikroorganismer har opbrugt et testkemikalie fuldstændigt under samtidig dannelse af kuldioxid, vand, mineralsalte og nye cellebestanddele (biomasse).

**Mineralisering:** fuldstændig nedbrydning af en organisk forbindelse til $CO_2$ og $H_2O$ under aerobe betingelser, og til $CH_4$, $CO_2$ og $H_2O$ under anaerobe betingelser.

**Lag-fase:** den tid, der går fra et forsøg begynder, indtil de nedbrydende mikroorganismer har tilpasset sig, og nedbrydningsgraden for et testkemikalie eller organisk materiale har nået et detekterbart omfang (f.eks. 10 % af den teoretiske maksimale bionedbrydning, evt. mindre, afhængigt af måleteknikkens nøjagtighed).

**Nedbrydningsfase:** tidsrummet mellem lag-periodens afslutning og det tidspunkt, hvor nedbrydningen har nået 90 % af sin maksimale værdi.

**Plateaufase:** den fase, hvor den maksimale nedbrydning er nået, og bionedbrydningskurven har udjævnet sig.

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

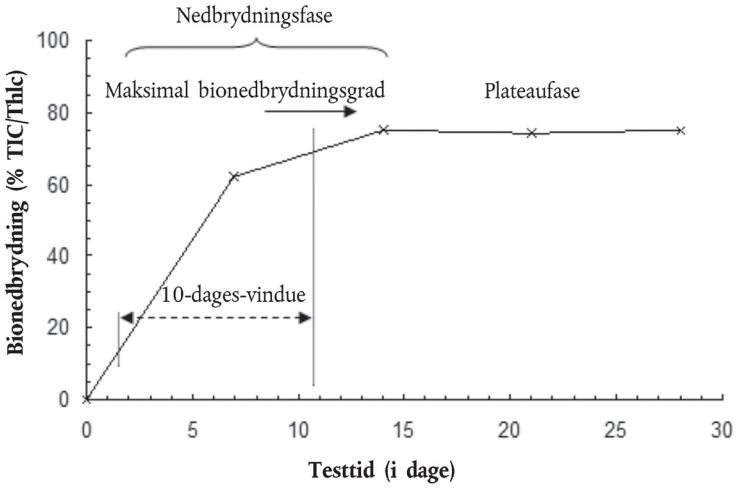
▼**M4**

*Tillæg 2*

**Eksempel på kurve for bionedbrydning**

*Figur 1*

**Bionedbrydning af 1-octanol i test af $CO_2$ i headspace**




Ordliste

Bionedbrydning

Nedbrydningsfase

Maksimal bionedbrydningsgrad

Plateaufase

10-dages-vindue

Testtid (i dage)

▼M4

## C.30. BIOAKKUMULERING I TERRESTRISKE OLIGOCHAETER

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD Test Guideline (TG) 317 (2010). Blandt testmetoderne vedrørende skæbne i miljøet blev Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk (kapitel C.13 i dette bilag (49)) og Bioakkumulering i bentiske oligochaeter, der lever i sediment (53), offentliggjort i henholdsvis 1996 og 2008. Ekstrapoleringen af data om akvatisk bioakkumulering til landorganismer, som f.eks. regnorm, er vanskelig, hvis overhovedet mulig. Modelberegninger baseret på et testkemikalies lipofile karakter, f.eks. (14) (37), anvendes i dag til at vurdere bioakkumulering af kemikalier i jord, som f.eks. EU's Technical Guidance Document (19). Behovet for en rumspecifik testmetode er allerede blevet imødekommet, f.eks. (55). En sådan metode er især vigtig for evalueringen af sekundær forgiftning i landbaserede fødekæder (4). Flere nationale testmetoder omhandler spørgsmålet om bioakkumulering i andre organismer end fisk, f.eks. (2) og (72). En metode vedrørende måling af bioakkumulering fra forurenet jord i regnorm (Eisenia fetida, Savigny) og kompostorm er udviklet af American Society for Testing and Materials (3). En internationalt anerkendt metode til bestemmelse af bioakkumulering i forurenet jord vil forbedre risikovurderingen af kemikalier i terrestriske økosystemer, f.eks. (25) (29).

2. Invertebrater, der lever af jord, eksponeres for jordbundne kemikalier. Blandt disse dyr spiller terrestriske oligochaeter en vigtig rolle for jordbundens struktur og funktion (15) (20). Terrestriske oligochaeter lever i jord og delvist på jordoverfladen (især i strølaget). De repræsenterer i mange tilfælde den mest rigelige art med hensyn til biomasse (54). Ved bioturbation af jorden og som byttedyr kan disse dyr have en stærk indvirkning på biotilgængeligheden af kemikalier for andre organismer, herunder invertebrater (såsom rovmider og biller; f.eks. (64)) eller vertebrate rovdyr (såsom ræve og måger) (18) (62). Nogle arter af terrestriske oligochaeter, som i øjeblikket anvendes i forbindelse med økotoksikologiske test, er beskrevet i tillæg 5.

3. ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus (3) indeholder mange vigtige og nyttige oplysninger om udførelsen af denne testmetode vedrørende bioakkumulering i jord. Yderligere dokumenter, der henvises til i denne testmetode, er kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk (49) og OECD TG 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates (53). Praktisk erfaring med forsøg vedrørende bioakkumulering i jord og publikationer, f.eks. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) og (79), er andre vigtige kilder til oplysninger i forbindelse med denne testmetode.

4. Denne testmetode gælder primært for stabile, neutrale organiske kemikalier, der ofte adsorberes til jord. Test for bioakkumulering af jordtilknyttede, stabile organiske metalforbindelser kan også udføres ved hjælp af denne testmetode. Den kan også anvendes i forbindelse med metaller og andre sporstoffer.

FORUDSÆTNINGER

5. Test, der har til formål at måle bioakkumuleringen af et kemikalie i terrestriske oligochaeter, er udført med tungmetaller (se f.eks. (63)) og persistente, organiske kemikalier med log $K_{ow}$-værdier mellem 3,0 og 6,0, f.eks. (40). Sådanne test kan også udføres i forbindelse med:

— kemikalier, der har en log $K_{ow}$ på mere end 6,0 (super-hydrofobe kemikalier)

▼M4

— kemikalier, der tilhører en klasse af organiske kemikalier, der vides at have potentialet til at bioakkumuleres i levende organismer, f.eks. overfladeaktive kemikalier eller kemikalier med høj adsorptionsevne

— kemikalier, hvis strukturelle karakteristika indicerer et potentiale for bioakkumulering, f.eks. analoger til kemikalier med kendt bioakkumuleringspotentiale, og

— metaller.

6. Oplysninger om testkemikaliet, f.eks. generisk navn, kemisk navn (fortrinsvis IUPAC-navn), strukturformel, CAS-nummer, renhed, sikkerhedsforanstaltninger, korrekt opbevaring og analysemetoder, indhentes, inden forsøget påbegyndes. Derudover skal følgende oplysninger foreligge:

a) opløselighed i vand

b) oktanol/vandfordelingskoefficient, $K_{ow}$

c) jord/vandfordelingskoefficient, $K_{oc}$

d) damptryk

e) nedbrydelighed (f.eks. i jord eller vand)

f) kendte metabolitter.

7. Der kan anvendes testkemikalier med og uden radioaktiv mærkning. Af hensyn til analysen anbefales det dog at bruge et radioaktivt mærket testkemikalie. Denne beslutning træffes ud fra detektionsgrænserne eller et krav om at måle et oprindeligt testkemikalie og metabolitter. Hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes, og den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles, er det vigtigt, at det radioaktive restmateriale i både jorden og testorganismerne karakteriseres med hensyn til procentdele af oprindeligt testkemikalie og mærkede ikke-oprindelige kemikalier, f.eks. i prøver udtaget ved steady state eller ved slutningen af optagelsesfasen, således at en bioakkumuleringsfaktor (BAF) kan beregnes for det oprindelige testkemikalie og de undersøgte jordmetabolitter (se afsnit 50). Den metode, der beskrives her, skal evt. tilpasses, f.eks. for at opnå tilstrækkelig biomasse, ved måling af organiske testkemikalier eller metaller, der ikke er radioaktivt mærkede. Hvis den samlede mængde radioaktivt restmateriale måles (ved hjælp af væskescintillationstælling efter ekstraktion, forbrænding eller opløsning af væv), baseres bioakkumuleringsfaktoren på det oprindelige testkemikalie og metabolitter. BAF-beregningen bør baseres på koncentrationen af det oprindelige testkemikalie i organismerne og den samlede mængde radioaktivt restmateriale. Efterfølgende beregnes biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF), normaliseret til fedtindholdet i orm og det organiske kulstofindhold i jord, ud fra BAF for at kunne sammenligne resultaterne mellem forskellige bioakkumuleringstest.

8. Testkemikaliets toksicitet for de arter, der anvendes i testen, skal være kendt, f.eks. en effektkoncentration (ECx) eller letal koncentration (LCx) på tidspunktet for optagelsesfasen (f.eks. (19)). Den valgte koncentration af testkemikaliet bør være ca. 1 % af den akutte asymptotiske $LC_{50}$ og mindst 10 gange højere end detektionsgrænsen i jord ved den anvendte analysemetode. Der anvendes fortrinsvis toksicitetsværdier fra langvarige forsøg vedrørende subletale effektparametre (51) (52), hvis de foreligger. Hvis sådanne data ikke er tilgængelige, vil en akut toksicitetstest give nyttige oplysninger (se f.eks. (23)).

▼M4

9. Der skal foreligge en passende analysemetode med kendt nøjagtighed, præcision og sensitivitet til kvantitativ bestemmelse af kemikaliet i testopløsninger, jord og biologisk materiale, oplysninger om, hvordan prøver forberedes og opbevares, samt sikkerhedsdatablade for materialer. Oplysninger om analytiske detektionsgrænser for testkemikaliet i jord og ormevæv skal også foreligge. Hvis der bruges et $^{14}C$-mærket testkemikalie, skal den specifikke radioaktivitet (dvs. Bq mol-1) og den procentdel af radioaktiviteten, der skyldes urenheder, være kendt. Testkemikaliets specifikke radioaktivitet skal være høj nok til at muliggøre analyse, og de anvendte testkoncentrationer må ikke fremkalde toksiske virkninger.

10. Testen kan udføres med syntetisk eller naturlig jord. Oplysninger om karakteristika for den anvendte naturlige jord, f.eks. jordens oprindelse eller bestanddele, pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og vandbindingsevne (WHC), skal foreligge, inden testen påbegyndes (3) (48).

TESTENS PRINCIP

11. De parametre, der karakteriserer bioakkumuleringen af et testkemikalie, omfatter bioakkumuleringsfaktoren (BAF), hastighedskonstanten for optagelse ($k_s$) og hastighedskonstanten for eliminering ($k_e$). Definitioner findes i tillæg 1.

12. Testen omfatter to faser: optagelsesfasen (eksponering) og elimineringsfasen (efter-eksponering). I optagelsesfasen eksponeres replikate grupper af orm for jord, der er »spiked« (forurenet) med testkemikaliet. Ud over testorganismerne holdes grupper af kontrolorm under identiske betingelser, men uden testkemikaliet. Testorganismernes tørvægt og fedtindhold måles. Dette kan gøres ved hjælp af orm i kontrolgruppen. Analytiske baggrundsværdier (blinde) kan fås ved at analysere prøver af kontrolorm og jord. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Der kræves altid en elimineringsfase, medmindre optagelsen af testkemikaliet i eksponeringsfasen har været ubetydelig. En elimineringsfase giver oplysninger om den hastighed, hvormed testkemikaliet udskilles af testorganismerne (f.eks. (27)). Hvis der ikke opnås steady state i optagelsesfasen, baseres bestemmelsen af de kinetiske parametre — kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAFk), hastighedskonstanter for optagelse og eliminering — fortrinsvis på samtidig tilpasning af resultaterne af optagelses- og elimineringsfaserne. Koncentrationen af testkemikaliet i/på ormene overvåges i løbet af begge faser i testen.

13. I løbet af optagelsesfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i op til 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), indtil steady state er opnået (11) (12) (67). Steady state opnås, når en kurve over koncentrationen i orm i forhold til tid bliver parallel med tidsaksen, og tre på hinanden følgende koncentrationsanalyser af prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for ± 20 % af hinanden baseret på statistiske sammenligninger (f.eks. variansanalyse og regressionsanalyse).

14. I elimineringsfasen overføres testorganismerne til beholdere med samme substrat, men uden testkemikaliet. I løbet af elimineringsfasen foretages målinger på prøvetagningstidspunkter i 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre tidligere analytisk bestemmelse har påvist en reduktion af reststoffer af testkemikaliet i orm på 90 %. Koncentrationen af testkemikaliet i ormene ved slutningen af elimineringsfasen rapporteres som

▼M4

ikke-eliminerede reststoffer. Steady state-bioakkumuleringsfaktoren (BAFss) beregnes så vidt muligt både som forholdet mellem koncentrationen i orm (Ca) og i jorden (Cs) ved steady state og som en kinetisk bioakkumuleringsfaktor (BAFk), som forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord (ks) og hastighedskonstanten for eliminering (ke) (definitioner findes i tillæg 1), idet kinetikken antages at være af første orden (beregninger findes i tillæg 2). Hvis det er åbenbart, at kinetikken ikke er af første orden, anvendes andre modeller.

15. Hastighedskonstanten for optagelse, hastighedskonstanten for eliminering (eller konstanterne, hvis andre modeller anvendes), den kinetiske bioakkumuleringsfaktor (BAFk) og så vidt muligt konfidensgrænserne for hver af disse parametre beregnes ud fra computerbaserede modelligninger (se vejledning i tillæg 2). En models tilpasningsgrad kan bestemmes ud fra f.eks. korrelationskoefficienten eller determinationskoefficienten (koefficienter tæt på én indicerer god tilpasning), eller den kan beregnes ved hjælp af chi i anden. Størrelsen af standardfejl eller konfidensinterval omkring de estimerede parametre kan også indicere modellens tilpasningsgrad.

16. For at reducere variabiliteten i testresultater for stærkt lipofile testkemikalier udtrykkes bioakkumuleringsfaktorer i forhold til fedtindholdet og det organiske kulstofindhold (kg organisk kulstof i jord kg-fedt i 1 orm). Denne tilgang er baseret på den kendsgerning, at der for nogle kemiske stofgrupper er en tydelig sammenhæng mellem kemikaliernes bioakkumuleringspotentiale og deres lipofile karakter. Dette er veldokumenteret for fisk (47). Der er en sammenhæng mellem fiskenes fedtindhold og sådanne kemikaliers bioakkumulering. For bentiske organismer er der konstateret lignende korrelationer, f.eks. (30) (44). For terrestriske oligochaeter er denne korrelation også påvist, f.eks. (5) (6) (7) (14). Hvis tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, kan testorganismernes fedtindhold bestemmes på det samme biologiske materiale som det, der benyttes til bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet. Alternativt kan fedtindholdet måles på kontroldyr.

TESTENS VALIDITET

17. Hvis en test skal være gyldig, skal følgende kriterier opfyldes af både kontroller og behandlingsprøver:

— Ved slutningen af testen må den samlede mortalitet i optagelses- og elimineringsfasen ikke overstige 10 % (regnorm) eller 20 % (enchytraeider) af det samlede antal tilførte orm.

— For Eisenia fetida og Eisenia andrei må det gennemsnitlige tab målt ved slutningen af optagelsesfasen og slutningen af elimineringsfasen ikke overstige 20 % sammenlignet med den indledende frisk vægt ved begyndelsen af hver fase.

BESKRIVELSE AF METODEN

**Forsøgsarter**

18. Der anbefales flere arter af terrestriske oligochaeter til test af bioakkumulering. De oftest anvendte arter, Eisenia fetida eller Eisenia andrei (Lumbricidae), Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus eller Enchytraeus luxuriosus (Enchytraeidae), er beskrevet i tillæg 5.

▼M4

**Apparatur**

19. Det skal omhyggeligt undgås, at der i nogen dele af udstyret anvendes materialer, som kan opløses, adsorbere testkemikaliet eller afgive andre kemikalier og have en skadelig virkning på testorganismerne. Der kan benyttes rektangulære eller cylindriske standardbeholdere af kemisk inert materiale og passende størrelse i forhold til mængden af forsøgsorm. Udstyr, der kommer i kontakt med testmedierne, kan være fremstillet af rustfrit stål, plast eller glas. Testbeholderne skal overdækkes for at forhindre, at ormene slipper ud, men der skal være tilstrækkelig luftforsyning. For kemikalier med høj adsorptionskoefficient, såsom syntetiske pyrethroider, kan det være nødvendigt at bruge silancoatet glas. I sådanne tilfælde skal udstyret kasseres efter brug (49). Udslip af radioaktivt mærkede testkemikalier og flygtige kemikalier skal forhindres. Udskillere (f.eks. gasvaskeflasker i glas) med egnede absorbenter anvendes til at tilbageholde reststoffer, der fordamper fra testbeholderne.

**Jord**

20. Testjord skal være af en sådan kvalitet, at testorganismerne kan overleve og helst forplante sig i akklimatiserings- og testperioden, uden at deres udseende eller adfærd bliver unormal. Ormene skal kunne grave sig ned i jorden.

21. Det anbefales at bruge den syntetiske jord, der er beskrevet i kapitel C.8 i dette bilag (48), som substrat i testene. Fremstilling af syntetisk jord til brug i bioakkumuleringstest og anbefalinger vedrørende opbevaring af syntetisk jord findes i tillæg 4. Lufttørret syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse.

22. Naturlig jord fra ikke-forurenede steder kan dog bruges som test- og/eller dyrkningsjord. Naturlig jord skal karakteriseres ved mindst oprindelse (opsamlingssted), pH, organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler) og maksimal vandbindingsevne (WHCmax) samt vandindhold i procent (3). En analyse af jorden eller dens bestanddele for mikroforurenere inden anvendelse kan give nyttige oplysninger. Hvis feltjord fra landbrugsarealer anvendes, må den ikke være blevet behandlet med plantebeskyttelsesmidler eller husdyrgødning fra behandlede dyr i mindst et år og med organisk gødning i mindst seks måneder inden prøvetagning (50). Fremgangsmåderne til håndtering af naturlig jord inden økotoksikologiske test med oligochaeter i laboratoriet er beskrevet i (3). Naturlig jord opbevares så kort tid i laboratoriet som muligt.

**Applikation af testkemikaliet**

23. Testkemikaliet indarbejdes i jorden. Testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber tages i betragtning. Et vandopløseligt testkemikalie opløses fuldstændigt i vand, inden det blandes med jorden. Den anbefalede spiking-procedure i forbindelse med testkemikalier, der er tungtopløselige i vand, omfatter overfladebehandling af en eller flere af bestanddelene i den naturlige eller syntetiske jord med testkemikaliet. Kvartssand eller en del heraf kan f.eks. gennemblødes med en opløsning af testkemikaliet i et egnet organisk opløsningsmiddel, som derefter langsomt fordamper, indtil det er tørt. Den overfladebehandlede andel blandes derefter med den våde jord.

▼M4

Den vigtigste fordel ved denne fremgangsmåde er, at der ikke tilsættes opløsningsmidler til jorden. Når naturlig jord anvendes, kan testkemikaliet tilsættes ved at spike en lufttørret del af jorden som beskrevet ovenfor for syntetisk jord eller ved at røre testkemikaliet ind i den våde jord. Dette efterfølges af et fordampningstrin, hvis en opløselighedsfremmer er blevet anvendt. Generelt bør det undgås, at den våde jord kommer i kontakt med opløsningsmidler. Følgende bør tages i betragtning (3):

— Hvis et andet opløsningsmiddel end vand anvendes, skal det kunne blandes med vand og/eller fjernes (f.eks. ved fordampning), så kun testkemikaliet er tilbage i jorden.

— Hvis der anvendes en opløsningsmiddelkontrol, er der ikke brug for en negativ kontrol. Opløsningsmiddelkontrollen skal indeholde den højeste koncentration af det opløsningsmiddel, der er tilført jorden, og skal være fra samme batch, som det middel, der er anvendt i stamopløsningen. Opløsningsmidlets toksicitet og flygtighed samt opløseligheden af testkemikaliet i det valgte opløsningsmiddel bør være de primære kriterier ved valget af en egnet opløselighedsfremmer.

24. I forbindelse med kemikalier, der er tungtopløselige i vand og organiske opløsningsmidler, kan 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder blandes med testkemikaliet, f.eks. ved hjælp af en morter og støder, for at opnå den ønskede testkoncentration. Denne blanding af kvartssand og testkemikalie tilsættes den fugtede jord og blandes grundigt med en passende mængde deioniseret vand for at opnå det krævede fugtindhold. Den færdige blanding fordeles i testbeholderne. Fremgangsmåden gentages for hver testkoncentration, og der klargøres også en kontrol med 2,0-2,5 g finsand af formalet kvarts pr. testbeholder.

25. Koncentrationen af testkemikaliet i jorden bestemmes efter spiking. Inden testorganismerne tilsættes, kontrolleres det, at testkemikaliet er ensartet fordelt i jorden. Den anvendte spiking-metode og begrundelsen for valget af den pågældende metode anføres i rapporten (24).

26. Der etableres ideelt ligevægt mellem jord- og porevandfasen, inden testorganismerne tilsættes. En periode på fire dage ved 20 °C anbefales. For mange organiske kemikalier, der er tungtopløselige i vand, kan det tage flere dage eller måneder at opnå ægte ligevægt mellem adsorberede og opløste andele. Afhængigt af forsøgets formål, hvis f.eks. miljøforholdene skal efterlignes, kan den spikede jord »ældes« i længere tid. Hvis det drejer sig om metaller, kan det f.eks. være tre uger ved 20 °C (22).

**Dyrkning af testorganismer**

27. Orm holdes fortrinsvis i permanente laboratoriesystemer. Vejledning om laboratoriedyrkningsmetoder findes i tillæg 5, for så vidt angår arterne Eisenia fetida, Eisenia andrei og Enchytraeid (se også (48) (51) (52)).

28. De orm, der anvendes i test, må ikke have synlige sygdomme, misdannelser eller parasitter.

UDFØRELSE AF TESTEN

29. Testorganismerne eksponeres for testkemikaliet i løbet af optagelsesfasen. Optagelsesfasen bør vare 14 dage (enchytraeider) eller 21 dage (regnorm), medmindre det kan påvises, at steady state er indtrådt.

▼M4

30. Ved elimineringsfasen overføres ormene til jord uden testkemikaliet. Den første prøve udtages 4-24 timer efter elimineringsfasens start. Eksempler på prøvetagningsplaner for en 21-dages optagelsesfase og en 21-dages elimineringsfase findes i tillæg 3.

**Testorganismer**

31. For mange arter af terrestriske enchytraeider er den individuelle vægt meget lav (f.eks. 5-10 mg vådvægt pr. individ for Enchytraeus albidus og mindre for Enchytraeus crypticus og Enchytraeus luxuriosus). For at kunne foretage vejningen og den kemiske analyse kan det være nødvendigt at samle ormene fra de replikate testbeholdere (dvs. alle orm i en replikat testbeholder bruges til at opnå et analyseresultat for væv). 20 individuelle enchytraeider tilsættes hver replikat, og der anvendes mindst tre replikater. Hvis den analytiske detektionsgrænse for testkemikaliet er meget høj, skal der muligvis bruges flere orm. For testarter med højere individuel vægt (Eisenia fetida og Eisenia andrei) kan der bruges replikate beholdere med ét individ.

32. De regnorm, der bruges i en test, bør være af ensartet vægt (Eisenia fetida og Eisenia andrei bør f.eks. have en individuel vægt på 250-600 mg). Enchytraeider (f.eks. Enchytraeus albidus) bør have en længde på ca. 1 cm. Alle orm i en bestemt test bør komme fra samme kilde og være voksne dyr med bælte (se tillæg 5). Da et dyrs vægt og alder kan have betydning for BAF-værdierne (f.eks. på grund af varierede fedtindhold og/eller tilstedeværelse af æg), registreres disse parametre nøjagtigt og under hensyntagen til fortolkningen af resultater. Desuden kan der i eksponeringsperioden være afsat kokoner, som også påvirker BAF-værdierne. Det anbefales, at man inden testen danner sig et skøn over gennemsnitsvægten (våd og tør) ved at veje en delprøve af testormene.

33. Der bør anvendes et højt jord-til-orm-forhold for at minimere reduktionen i koncentrationen af testkemikaliet i jorden i løbet af optagelsesfasen. Til Eisenia fetida og Eisenia andrei anbefales som minimum 50 g jord (tørvægt) pr. orm, og til enchytraeider anbefales som minimum 10-20 g jord (tørvægt) pr. testbeholder. Beholderne skal indeholde et jordlag på 2-3 cm (enchytraeider) eller 4-5 cm (regnorm).

34. De orm, der anvendes i en test, udtages fra dyrkningssystemet (f.eks. enchytraeider med pincet). Voksne dyr overføres fra ubehandlet testjord med henblik på akklimatisering og fodres (se afsnit 36). Hvis testbetingelserne adskiller sig fra dyrkningsbetingelserne, er en akklimatiseringsfase på 24-72 timer nok til at tilpasse ormene til testbetingelserne. Efter akklimatisering skylles ormene ved at overføre dem til glasplader (f.eks. petriglas) med rent vand. Efterfølgende vejes de, inden de tilsættes testjorden. Inden vejningen fjernes overskydende vand fra ormene ved forsigtigt at holde dem mod kanten af glaspladen eller duppe dem forsigtigt med et let fugtigt papirhåndklæde.

35. Testorganismernes nedgravningsadfærd observeres og registreres. I test med regnorm vil dyrene (kontrol og behandlingsprøver) normalt grave sig ned i jorden inden for en periode på få timer. Dette kontrolleres senest 24 timer efter tilsætning af ormene til testbeholderne. Hvis regnormene ikke graver sig ned (f.eks. mere end 10 % i løbet af mere end halvdelen af optagelsesfasen), indicerer det, at testbetingelserne ikke er hensigtsmæssige, eller at

▼M4

testorganismerne ikke er sunde. I det tilfælde afbrydes testen, hvorefter den gentages. Enchytraeider lever primært i de interstitielle porer i jorden, og deres integument er ofte kun i delvis kontakt med det omgivende substrat. Eksponering af gravende og ikke-gravende enchytraeider antages at være den samme, og en test skal ikke nødvendigvis gentages, selv om enchytraeider ikke graver sig ned.

**Fodring**

36. Fodring planlægges, hvis der anvendes jord med lavt samlet organisk kulstofindhold. Hvis der anvendes syntetisk jord, anbefales ugentlig fordring (dvs. ormene fodres én gang om ugen) bestående af 7 mg tørret møg pr. g jord (tørvægt) til regnorm, og en ugentlig fodring bestående af 2-2,5 mg malede havregryn pr. g jord (tørvægt) til enchytraeider (11). Den første foderration blandes i jorden umiddelbart inden tilsætningen af testorganismerne. Der anvendes fortrinsvis samme type foder som i dyrkningssystemet (se tillæg 5).

**Lys og temperatur**

37. Testene gennemføres under reguleret belysning med 16 timers lys og 8 timers mørke, helst 400-800 lux, i det område, hvor testbeholderne opbevares (3). Testtemperaturen skal være 20 ± 2 °C i hele testen.

**Testkoncentrationer**

38. Der anvendes én koncentration. Situationer, hvor yderligere koncentrationer kræves, skal begrundes. Hvis testkemikaliets toksicitet (ECx) ligger tæt på den analytiske detektionsgrænse, bør et radioaktivt mærket testkemikalie med høj specifik radioaktivitet anvendes. For metaller bør koncentrationen ligge over baggrundsniveauet i væv og jord.

**Replikater**

39. Til kinetiske målinger (optagelses- og elimineringsfasen) skal antallet af behandlede replikate beholdere som minimum være tre pr. prøvetagningstidspunkt. Der skal klargøres et tilstrækkeligt antal replikater til at dække alle prøvetagningstidspunkter i optagelses- og elimineringsfasen.

40. Til biologiske observationer og målinger (f.eks. forhold mellem tør- og vådvægt, fedtindhold osv.) og til analyse af baggrundskoncentrationer i orm og jord skal der bruges mindst 12 replikatbeholdere med en negativ kontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), hvis der ikke anvendes et andet opløsningsmiddel end vand. Hvis der anvendes en opløselighedsfremmer til tilsætning af testkemikaliet, skal der tilvejebringes en opløsningsmiddelkontrol (fire prøver ved start, fire ved afslutning af optagelse og fire ved afslutning af eliminering), som indeholder alle bestanddele med undtagelse af testkemikaliet, ud over de behandlede replikater. I dette tilfælde kan der også klargøres fire yderligere replikate beholdere til en negativ kontrol (intet opløsningsmiddel) til evt. prøvetagning ved afslutningen af optagelsesfasen. Disse replikater kan derefter sammenlignes biologisk med opløsningsmiddelkontrollen for at få oplysninger om en mulig indvirkning af opløsningsmidlet på testorganismerne. Det anbefales, at der klargøres et tilstrækkeligt antal yderligere replikate reservebeholdere (f.eks. otte) til behandlingsprøver og kontrol.

▼M4

**Hyppighed af målinger af jordkvaliteten**

41. Jordens pH, jordens fugtindhold og temperaturen (kontinuerlig) i testrummet måles ved begyndelsen og slutningen af optagelses- og elimineringsfasen. En gang om ugen kontrolleres jordens fugtindhold ved at veje testbeholderne og sammenligne de faktiske vægte med de indledende vægte ved testens begyndelse. Vandtab kompenseres ved tilsætning af deioniseret vand.

**Prøvetagning og analyse af orm og jord**

42. Et eksempel på en tidsplan for optagelses- og elimineringsfasen i test af bioakkumulering i regnorm og enchytraeider findes i tillæg 3.

43. Der udtages prøver af jorden fra testbeholderne med henblik på bestemmelse af testkemikaliekoncentrationen, både inden ormene tilsættes og i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. I løbet af testen måles koncentrationerne af testkemikaliet i ormene og jorden. Generelt måles de samlede koncentrationer i jord. Koncentrationer i porevand kan også måles. I det tilfælde bør begrundelsen og metoderne fastlægges, inden forsøget indledes, og anføres i rapporten.

44. Der tages prøver af orm og jord mindst seks gange i løbet af optagelses- og elimineringsfasen. Hvis stabiliteten af et testkemikalie påvises, kan antallet af jordanalyser reduceres. Der bør analyseres mindst tre replikater ved begyndelsen af afslutningen af optagelsesfasen. Hvis den koncentration i jord, der måles ved afslutningen af optagelsesfasen, afviger fra den indledende koncentration med mere end 30 %, analyseres jordprøver udtaget på de andre datoer også.

45. Udtag ormene fra jorden i en replikatbeholder på hvert prøvetagningstidspunkt (f.eks. efter at have spredt jorden i beholderen ud på en bakke og samlet ormene op med en pincet), skyl dem hurtigt med vand i et lavt glas eller på en stålbakke. Fjern overskydende vand (se afsnit 34). Overfør forsigtigt ormene til en allerede vejet beholder, og vej dem straks med tarmindhold.

46. Regnormene (Eisenia sp.) placeres derefter på f.eks. fugtigt filterpapir i en overdækket petriskål (se afsnit 34) natten over, så de kan tømme deres tarme. Efter udtømning bestemmes ormenes vægt, så en evt. reduktion i biomasse i løbet af testen kan vurderes (se validitetskriterierne i afsnit 17). Vejning og vævsanalyse af enchytraeider udføres uden tømning af tarme, da det er teknisk vanskeligt på grund af disse ormes lille størrelse. Straks efter den endelige fastlæggelse af vægten aflives ormene på den mest hensigtsmæssige måde (f.eks. ved hjælp af flydende nitrogen eller nedfrysning ved temperaturer under – 18 °C).

47. I løbet af elimineringsfasen udskifter ormene forurenet tarmindhold med ren jord. Det betyder, at målinger i ikke-udtømte orm (enchytraeider i denne sammenhæng), der udtages umiddelbart inden elimineringsfasen, omfatter forurenet tarmjord. For akvatiske oligochaeters vedkommende antages det, at størstedelen af det forurenede tarmindhold er blevet erstattet af rent sediment efter de første 4-24 timer af elimineringsfasen (se f.eks. (46)). Lignende resultater er rapporteret for regnorm i forsøg vedrørende akkumulering af radioaktivt mærket cadmium og zink (78). For så vidt angår ikke-udtømte enchytraeider, kan koncentration af denne første prøve i løbet af elimineringsfasen betragtes som koncentrationen i væv efter tarmtømning. For at tage højde for den uforurenede jords fortynding af testkemikaliekoncentrationen i løbet af elimineringsfasen kan vægten af tarmindholdet estimeres ud fra forholdet mellem ormenes vådvægt/ormenes askevægt eller ormenes tørvægt/ormenes askevægt.

▼M4

48. Jord- og ormeprøver bør analyseres umiddelbart efter udtagningen (dvs. inden for 1-2 dage), så man undgår nedbrydning eller andre former for tab, og så der løbende under testen kan beregnes omtrentlige optagelses- og elimineringshastigheder. Hvis analysen forsinkes, opbevares prøverne på en hensigtsmæssig måde, f.eks. ved dybfrysning (≤ – 18 °C).

49. Det kontrolleres, at den kemiske analyse giver tilfredsstillende præcision, reproducerbarhed og genfinding af testkemikaliet i både jord og orm for den valgte metode. Ekstraktionsgraden, detektionsgrænsen (LOD) og kvantificeringsgrænsen (LOQ) rapporteres. Det kontrolleres ligeledes, at testkemikaliet ikke kan detekteres i kontrolbeholderne i højere koncentrationer end baggrundskoncentrationerne. Hvis koncentrationen af testkemikaliet i testorganismen Ca er > 0 i kontrolormene, medtages dette i beregningen af de kinetiske parametre (se tillæg 2). Alle prøver håndteres i hele testen på en sådan måde, at kontaminering og tab (f.eks. som følge af adsorption af testkemikaliet til prøvetagningsudstyret) minimeres.

50. Når der anvendes radioaktivt mærkede testkemikalier, kan det oprindelige testkemikalie og metabolitter analyseres. Kvantificering af det oprindelige testkemikalie og metabolitter ved steady state eller ved afslutningen af optagelsesfasen giver vigtige oplysninger. Prøverne »oprenses« derefter, så det oprindelige testkemikalie kan kvantificeres separat. Hvis individuelle metabolitter overstiger 10 % af den samlede radioaktivitet i de analyserede prøver, bør disse metabolitter identificeres.

51. Den samlede genfinding og genfindingen af testkemikalie i orm, jord og evt. udskillere, der indeholder absorbenter for at fastholde fordampet testkemikalie, registreres og rapporteres.

52. Individer udtaget fra en testbeholder kan samles i en pool, hvis det drejer sig om enchytraeider, som er mindre end regnorm. Hvis denne »pooling« reducerer antallet af replikater, indskrænkes mulighederne for statistisk behandling af dataene. Hvis der kræves en bestemt statistisk metode og styrke, bør testen omfatte tilstrækkeligt mange replikate testbeholdere til, at den ønskede pooling, metode og styrke tilgodeses.

53. BAF bør udtrykkes både som funktion af samlet tørvægt og som funktion af fedtindholdet, hvis det kræves (f.eks. for meget hydrofobe kemikalier). Fedtindholdet bestemmes ved hjælp af egnede metoder. Eksisterende metoder, f.eks. (31) og (58), tilpasses til dette formål. Disse metoder anvender ekstraktion med chloroform/methanol. For at undgå brugen af chlorerede opløsningsmidler bør der anvendes en tilpasning af Bligh og Dyer-metoden (9) som beskrevet i (17). Da de forskellige metoder ikke giver identiske værdier, er det vigtigt at give nærmere oplysninger om den anvendte metode. Når det er muligt, dvs. når tilstrækkeligt ormevæv er tilgængeligt, skal lipidanalysen foretages på samme prøve eller ekstrakt som det, der blev anvendt til analyse for testkemikaliet, eftersom lipiderne ofte skal fjernes fra ekstraktet, inden det kan analyseres ved gaskromatografi (49). Alternativt kan fedtindholdet måles på kontroldyr og derefter anvendes til at normalisere BAF-værdier. Sidstnævnte tilgang reducerer forureningen af udstyr med testkemikaliet.

▼M4

DATA OG RAPPORTERING

**Behandling af resultater**

54. Testkemikaliets optagelseskurve fås ved at afsætte koncentrationen i/på ormene i løbet af optagelsesfasen i forhold til tiden (lineære akser). Når kurven når et plateau, eller steady state (se definitioner i tillæg 1), beregnes steady state-bioakkumuleringsfaktoren BAFss ved hjælp af:

$$\frac{C_a \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}{C_s \text{ ved steady state eller afslutning af optagelsesfase (gennemsnit)}}$$

$C_a$ er koncentrationen af testkemikalie i testorganisme

$C_s$ er koncentrationen af testkemikalie i jord

55. Hvis steady state ikke nås, bestemmes BAFk, baseret på hastighedskonstanter, i stedet for BAFss, som beskrevet nedenfor:

— Bestem akkumuleringsfaktoren ($BAF_K$) som forholdet $k_s/k_e$.

— Optagelses- og elimineringshastigheder beregnes helst samtidig (se ligning 11 i tillæg 2).

— Hastighedskonstanten for eliminering ($k_e$) bestemmes normalt ud fra elimineringskurven (dvs. en afbildning af koncentrationen af testkemikaliet i ormene i løbet af elimineringsfasen). Dernæst beregnes hastighedskonstanten for optagelse ($k_s$) på grundlag af $k_e$ og en værdi af $C_a$, som udledes af optagelseskurven (disse metoder er også beskrevet i tillæg 2). Til at finde $BAF_K$ og hastighedskonstanterne, $k_s$ og $k_e$ foretrækkes computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder. Hvis det er åbenbart, at elimineringen ikke er af første orden, anvendes andre modeller.

**Testrapport**

56. Testrapporten bør indeholde følgende oplysninger:

*Testkemikalie:*

— alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliets akutte toksicitet eller langtidstoksicitet (f.eks. $EC_x$, $LC_x$ og NOEC) over for terrestriske oligochaeter

— renhed, fysisk tilstand og fysisk-kemiske egenskaber, f.eks. log $K_{ow}$ og vandopløselighed

— kemisk identifikation; testkemikaliets herkomst, identitet og koncentration af evt. opløsningsmiddel

— hvis et radioaktivt mærket testkemikalie anvendes: den præcise position af de mærkede atomer, den specifikke radioaktivitet og den radiokemiske renhed.

*Testart:*

— videnskabeligt navn, stamme, herkomst, evt. forbehandling, akklimatisering, alder, størrelse osv.

▼M4

*Testbetingelser:*

— anvendt testfremgangsmåde

— belysningskildens art og karakteristika og belysningsperiodernes varighed

— testdesign (f.eks. testbeholdernes antal og størrelse, jordmasse og højde af jordlag, antal replikater, antal orm pr. replikat, antal testkoncentrationer, varighed af optagelses- og elimineringsfaser samt prøvetagningshyppighed)

— begrundelse for valget af testbeholdermateriale

— metode til klargøring og applikation af testkemikalie samt begrundelse for valg af specifik metode

— de nominelle testkoncentrationer, gennemsnittet af de målte værdier og deres standardafvigelser i testbeholderne og den metode, der er benyttet til at bestemme disse værdier

— oprindelsen af bestanddele i syntetisk jord eller — hvis naturlige medier er anvendt — oprindelsen af jorden, beskrivelse af evt. forbehandling, resultater af kontroller (overlevelse, biomasseudvikling og reproduktion), jordkarakteristika (pH, samlet organisk kulstofindhold, partikelstørrelsesfordeling (procent sand, silt og ler), $WHC_{max}$, vandindhold i procent ved testens start og afslutning og evt. andre målinger)

— detaljerede oplysninger om, hvordan jord- og ormeprøver er behandlet, herunder forberedelse, opbevaring, spiking, ekstraktion og analysemetoder (og præcision) for testkemikalie i orm og jord og fedtindhold (hvis bestemt) samt genfinding af testkemikaliet.

*Resultater:*

— mortalitet for kontrolorm og orm i hver testbeholder samt evt. iagttaget unormal adfærd (f.eks. undvigelse af jord eller manglende reproduktion i bioakkumuleringstest med enchytraeider)

— forholdet mellem tørvægt og vådvægt for jord og testorganismer (anvendes til normalisering)

— ormenes vådvægt på hvert prøvetagningstidspunkt; for regnorm også vådvægten ved begyndelsen af testen og på hvert prøvetagningstidspunkt før og efter udtømning af tarme

— testorganismernes fedtindhold (hvis bestemt)

— kurver, der viser optagelses- og elimineringskinetikken for testkemikaliet i ormene samt tiden til steady state

— $C_a$ og $C_s$ (med standardafvigelse og interval, hvis det er relevant) på alle prøvetagningstidspunkter ($C_a$ udtrykt i g $kg^{-1}$ våd- og tørvægt af legemsvægt, $C_s$ udtrykt i g $kg^{-1}$ våd- og tørvægt af jord). Hvis en biota-jord-akkumuleringsfaktor (BSAF) kræves (f.eks. til sammenligning af resultaterne fra to eller flere test udført med dyr med forskelligt fedtindhold), kan $C_a$ også udtrykkes som g $kg^{-1}$ fedtindhold i organismen, og $C_s$ kan udtrykkes som g $kg^{-1}$ organisk kulstofindhold i jorden

— BAF (udtrykt i kg jord·$kg^{-1}$ orm), hastighedskonstant for optagelse fra jord $k_s$ (udtrykt i g jord $kg^{-1}$ orm $dag^{-1}$) og hastighedskonstant for eliminering $k_e$ (udtrykt i $dag^{-1}$); BSAF (udtrykt i kg jord organisk kulstofindhold $kg^{-1}$ orm fedtindhold) kan også rapporteres

▼M4

— hvis målt: procentdele af oprindeligt kemikalie, metabolitter og bundne reststoffer, dvs. den procentdel af testkemikalie, der ikke kan ekstraheres med almindelige ekstraktionsmetoder, detekteret i jord og testorganismer

— metoder, der er anvendt til statistisk analyse af data.

*Evaluering af resultater:*

— resultaternes overensstemmelse med validitetskriterierne i afsnit 17

— uventede eller usædvanlige resultater, f.eks. ufuldstændig eliminering af testkemikaliet fra testorganismerne.

*LITTERATUR:*

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 s.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. I Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG og Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 s.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM og Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW og Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, I: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Nederlandene, s. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF, EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

(20) Edwards CA og Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 s.

(21) OECD (2008), *Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates*, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th og Römbke J (2009). Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten. Rapport til den tyske miljøstyrelse (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 s. Findes på: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 s.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 s.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF — Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW og Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K og Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Soil Quality — Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.

(36) Jaenike J (1982). »*Eisenia foetida*« is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von $^{14}$C-Hexachlorbenzol und $^{14}$C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 s.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log $K_{ow}$/log BCF correlations, I: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme.

(49) Kapitel C.13 i dette bilag, Biokoncentrering: Gennemstrømningstest med fisk.

(50) Kapitel C.21 i dette bilag, Jordmikroorganismer: Kvælstofomdannelsestest.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(54) Petersen H og Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. I: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 s.

(60) Römbke J og Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, I: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J og Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R og Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93-100.

▼M4

(66) Sims R W og Gerard BM (1985). Earthworms, I: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557-2563.

(68) Spacie A og Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. I: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation — Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marts 2000.

(73) Van Brummelen TC og Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, I: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA og Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM og Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B og Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402-406.

▼M4

*Tillæg 1*

DEFINITIONER

**Bioakkumulering**: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium. Bioakkumulering er resultatet af både biokoncentrerings- og biomagnifikationsprocesser (se nedenfor).

**Biokoncentration**: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme som følge af optagelsen af kemikaliet alene fra det omgivende medium (dvs. via legemsflade og fordøjet jord) i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium.

**Biomagnifikation**: en koncentrationsforøgelse af testkemikaliet i eller på en organisme primært som følge af optagelsen af forurenet foder eller bytte i forhold til koncentrationen af testkemikaliet i foder eller bytte. Biomagnifikation kan medføre overførsel eller akkumulering af testkemikaliet i fødekæder.

**Eliminering** af testkemikalie: tabet af kemikaliet fra testorganismens væv ved aktive eller passive processer, der forekommer uafhængigt af tilstedeværelsen eller fraværet af testkemikaliet i det omgivende medium.

**Bioakkumuleringsfaktoren** (BAF) på ethvert tidspunkt i denne bioakkumuleringstests optagelsesfase: koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen ($C_a$ i $g \cdot kg^{-1}$ tørvægt orm) divideret med koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium ($C_s$ som $g \cdot kg^{-1}$ tørvægt jord); BAF angives i enheder af kg jord$\cdot kg^{-1}$ orm.

**Steady state-bioakkumuleringsfaktor** ($BAF_{ss}$): er BAF ved steady state og ændres ikke signifikant over en længere periode, idet koncentrationen af testkemikaliet i det omgivende medium ($C_s$ som $g.kg^{-1}$ tørvægt jord) er konstant i denne tidsperiode.

**Bioakkumuleringsfaktorer** beregnet direkte ud fra forholdet mellem hastighedskonstanten for optagelse fra jord og hastighedskonstanten for eliminering ($k_s$ og $k_e$, se nedenfor) betegnes kinetisk bioakkumuleringsfaktor ($BAF_K$).

**Biota-jord-akkumuleringsfaktoren** (BSAF): den fedtindholdsnormaliserede koncentration af testkemikaliet i eller på testorganismen divideret med den organisk kulstofnormaliserede koncentration af testkemikaliet i jorden ved steady state. $C_a$ udtrykkes da som $g \cdot kg^{-1}$ fedtindhold i organismen, og $C_s$ som $g \cdot kg^{-1}$ organisk indhold i jorden; BSAF angives i enheder af kg organisk kulstof$\cdot kg^{-1}$ fedt.

**Plateau** eller **steady state**: ligevægten mellem de optagelses- og elimineringsprocesser, der forekommer samtidig i løbet af eksponeringsfasen. Man taler om steady state i afbildningen af BAF i forhold til tiden, når kurven bliver parallel med tidsaksen, når tre på hinanden følgende analyser af BAF i prøver, der er udtaget med mindst to dages mellemrum, ligger inden for 20 % af hinanden, og når der ikke er nogen signifikante forskelle mellem de tre prøvetagningsperioder. For testkemikalier, der optages langsomt, vil et interval på syv dage være mere passende (49).

**Organisk kulstof/vandfordelingskoefficient** ($K_{oc}$): forholdet mellem et kemikalies koncentration i eller på andelen af organisk kulstof i jord og kemikaliets koncentration i vand ved ligevægt.

**Octanol-vandfordelingskoefficient** ($K_{ow}$): forholdet mellem et kemikalies opløselighed i n-octanol og vand ved ligevægt, også betegnet $P_{ow}$. Logaritmen til $K_{ow}$ (log $K_{ow}$) benyttes som rettesnor for et kemikalies potentiale for bioakkumulering i vandorganismer.

▼M4

**Optagelses- eller eksponeringsfasen:** det tidsrum, hvori testorganismerne udsættes for testkemikaliet.

**Hastighedskonstanten for optagelse fra jord** ($k_s$): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den forøgelse af koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen, der følger af fasen for optagelse fra jord. $k_s$ udtrykkes i g jord $kg^{-1}$ orm $d^{-1}$.

**Elimineringsfasen**: tidsrummet efter overførsel af testorganismerne fra et forurenet medium til et medium uden testkemikaliet, hvor elimineringen (eller nettotabet) af kemikaliet fra testorganismerne undersøges.

**Hastighedskonstanten for eliminering** ($k_e$): den numeriske værdi, som definerer hastigheden for den reduktion af koncentrationen af testkemikaliet i eller på testorganismen, efter at testorganismerne er overført fra et medium med testkemikaliet til et medium uden dette stof; $k_e$ udtrykkes i $d^{-1}$.

**Testkemikalie:** ethvert stof eller enhver blanding, der testes ved hjælp af denne testmetode.

▼M4

*Tillæg 2*

**Beregning af parametre for optagelse og eliminering**

Den primære effektparameter i en bioakkumuleringstest er bioakkumuleringsfaktoren, BAF. Den målte BAF beregnes ved at dividere koncentration i testorganismen, $C_a$, med koncentrationen i jord, $C_s$, ved steady state. Hvis steady state ikke nås i optagelsesfasen, beregnes $BAF_K$ ud fra hastighedskonstanter i stedet for BAFss. Det skal angives, om BAF er baseret på steady state-koncentrationer.

Den kinetiske bioakkumuleringsfaktor ($BAF_K$), hastighedskonstanten for optagelse fra jord ($k_s$) og hastighedskonstanten for eliminering ($k_e$) fås sædvanligvis ved at bruge computerbaserede ikke-lineære parameterestimeringsmetoder, f.eks. baseret på de modeller, der er beskrevet i (68). Ud fra et sæt sekventielle data for koncentration og tid og modelligningerne:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 1]}$$

eller

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 2]}$$

hvor:

$C_a$ = koncentration af kemikalie i orm [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$k_s$ = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg-1 orm d-1]

$C_s$ = koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$k_e$ = hastighedskonstant for eliminering [d-1]

$t_c$ = tid ved afslutningen af optagelsesfasen

beregner disse computerprogrammer værdier for $BAF_K$, $k_s$ og $k_e$.

Når baggrundskoncentration i ikke-eksponerede orm, f.eks. på dag 0, adskiller sig signifikant fra nul (det kan f.eks. være tilfældet for metaller), skal denne baggrundskoncentration ($C_{a,0}$) medtages i ligningerne, så de lyder:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 3]}$$

og

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 4]}$$

Hvis der observeres et signifikant fald i koncentrationen af testkemikaliet i jord i løbet af optagelsesfasen, kan følgende model anvendes, f.eks. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[ligning 5]}$$

▼**M4**

hvor:

$C_s$ = koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$k_0$ = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d-1]

$C_0$ = indledende koncentration af kemikalie i jord [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ligning 7]}$$

hvor:

$C_a$ = koncentration af kemikalie i orm [g kg-1 våd- eller tørvægt]

$k_s$ = hastighedskonstant for optagelse i væv [g jord kg-1 orm d-1]

$k_0$ = hastighedskonstant for nedbrydning i jord [d-1]

$k_e$ = hastighedskonstant for eliminering [d-1]

$t_c$ = tid ved afslutningen af optagelsesfasen.

Når steady state opnås i løbet af optagelsesfasen (dvs. $t = \infty$), kan ligning 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ligning 1]}$$

reduceres til:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

eller

$$C_a/C_s = k_s/k_e = BAF_K \qquad \text{[ligning 8]}$$

I så fald er $k_s/k_e$ x $C_s$ en tilgang til koncentrationen af testkemikaliet i ormevæv ved steady state ($C_{a,ss}$).

Biota-jord-akkumuleringsfaktoren (BSAF) beregnes på følgende måde:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ligning 9]}$$

hvor $f_{oc}$ er andelen af organisk kulstof i jord, $f_{lip}$ er andelen af fedtindhold i orm, som begge fortrinsvis bestemmes på prøver udtaget fra testen og baseret på henholdsvis tørvægt eller vådvægt.

Elimineringskinetikken kan modelleres ved hjælp af data fra elimineringsfasen og ved anvendelse af følgende modelligning og en computerbaseret ikke-lineær parameterestimeringsmetode. Hvis de datapunkter, der er afsat i forhold til tid, indicerer et konstant eksponentielt fald i koncentrationen af testkemikaliet i testorganismerne, kan en etrumsmodel (ligning 9) bruges til at beskrive tidsforløbet for eliminering.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ligning 10]}$$

▼M4

Elimineringsprocesser kan være tofasede og udvise et hurtigt fald i $C_a$ i begyndelsen, som ændres til et langsommere tab af testkemikalie i slutningen af elimineringsfasen, f.eks. (27) (68). De to faser kan fortolkes ud fra den antagelse, at der er to forskellige rum i organismen, hvorfra testkemikalie går tabt med forskellige hastigheder. I sådanne tilfælde henvises til specifik litteratur, f.eks. (38) (39) (40) (78).

Ved hjælp af modelligningerne ovenfor kan de kinetiske parametre ($k_s$ og $k_e$) også beregnes i ét trin ved at anvende modellen for førsteordenskinetik på alle data fra både optagelses- og elimineringsfasen samtidig. En beskrivelse af en metode, der understøtter en sådan kombineret beregning af hastighedskonstanterne for optagelse og eliminering, findes i (41) (73) og (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[ligning 11]}$$

*Bemærk:* Når optagelses- og elimineringsparametre estimeres samtidig fra de kombinerede optagelses- og elimineringsdata, er »m« som vist i ligning 11 en deskriptor, der sætter computerprogrammet i stand til at tildele ligningens underled til datasættene for den enkelte fase og udføre evalueringen korrekt (m = 1 for optagelsesfasen; m = 2 for elimineringsfasen).

Disse modelligninger skal dog bruges med forsigtighed, især når testkemikaliets biotilgængelighed eller (bio)nedbrydning ændres i løbet af testen (se f.eks. (79)).

▼**M4**

*Tillæg 3*

EKSEMPLER PÅ TIDSPLANER FOR BIOAKKUMULERINGSTEST

**Test med regnorm**

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| – 6 | Konditionering af fremstillet jord i 48 timer. |
| – 4 | Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrering ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal). |
| – 3 til – 1 | Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele. |
| 0 | Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delprøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem. |
| 1 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie. |
| 2 | Samme som dag 1. |
| 3 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. |
| 4 | Samme som dag 1. |
| 5 til 6 | Samme som dag 3. |
| 7 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand. |
| 8 til 9 | Samme som dag 3. |
| 10 | Samme som dag 1. |
| 11 til 13 | Samme som dag 3. |
| 14 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand. |
| 15 til 16 | Samme som dag 3. |
| 17 | Samme som dag 1. |
| 18 til 20 | Samme som dag 3. |

▼**M4**

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| 21 | Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller. |
| | Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliets egenskaber. |
| | Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage). |

b) Elimineringsfase

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| – 6 | Fremstilling og befugtning af jordbestanddele. Konditionering af fremstillet jord i 48 timer. |
| – 4 | Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Inkubation ved testbetingelser i fire dage. |
| 0 (afslutning af optagelsesfase) | Måling af temperatur og pH i jord. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Tilsætning af foderration. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord. Udtagning af jord- og ormeprøver efter 4-6 timer med henblik på bestemmelse af koncentrationen af testkemikaliet. |
| 1 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af testkemikalie. |
| 2 | Samme som dag 1. |
| 3 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. |
| 4 | Samme som dag 1. |
| 5 til 6 | Samme som dag 3. |
| 7 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand. |
| 8 til 9 | Samme som dag 3. |
| 10 | Samme som dag 1. |
| 11 til 13 | Samme som dag 3. |
| 14 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand. |
| 15 til 16 | Samme som dag 3. |
| 17 | Samme som dag 1. |

▼M4

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| 18 til 20 | Samme som dag 3. |
| 21 | Samme som dag 1. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller. |
| | Inden starten på elimineringsfasen skal jord fremstilles på samme måde som inden optagelsesfasen. |
| | Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage). |

**Test med enchytraeider**

a) Optagelsesfase med otte prøvetagningsdatoer til beregning af kinetik

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| – 6 | Konditionering af fremstillet jord i 48 timer. |
| – 4 | Spiking af jordandel med opløsning af testkemikaliet. Fordampning af opløsningsmiddel. Blanding af jordbestanddele. Fordeling af jord til testbeholdere. Ækvilibrering ved testbetingelser i fire dage (tre uger for jord spiked med metal). |
| – 3 til – 1 | Udtagning af testorganismer fra dyrkningssystem til akklimatisering. Fremstilling og befugtning af jordbestanddele. |
| 0 | Måling af temperatur og pH i jord. Udtagning af jordprøver fra behandlede beholdere og opløsningsmiddelkontroller til bestemmelse af koncentration af testkemikalie. Tilsætning af foderration. Vejning og randomiseret fordeling af orme til testbeholdere. Opbevaring af tilstrækkeligt antal delprøver af orm til bestemmelse af analytiske baggrundsværdier, våd- og tørvægt og fedtindhold. Vejning af alle testbeholdere for at kontrollere fugtindhold i jord. Kontrol af luftforsyning ved anvendelse af lukket testsystem. |
| 1 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. Udtagning af jord- og ormeprøver med henblik på bestemmelse af koncentration af teststof. |
| 2 | Samme som dag 1. |
| 3 | Kontrol af luftforsyning. Registrering af ormenes opførsel og temperatur. |
| 4 | Samme som dag 1. |
| 5 til 6 | Samme som dag 3. |
| 7 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Kompensation for fordampet vand. |
| 9 | Samme som dag 1. |
| 10 | Samme som dag 3. |

▼**M4**

| Dag | Aktivitet |
|---|---|
| 11 | Samme som dag 1. |
| 12 til 13 | Samme som dag 3. |
| 14 | Samme som dag 1. Tilsætning af foderration til jord. Måling af temperatur og pH i jord. Kontrol af fugtindhold i jord ved gentaget vejning af testbeholdere. Afslutning af optagelsesfase. Overførsel af orm fra resterende eksponerede replikater til beholdere med ren jord til elimineringsfasen (ingen tarmudtømning). Prøvetagning af jord og orm fra opløsningsmiddelkontroller. |
| | Aktiviteter før eksponering (ækvilibreringsfase) planlægges under hensyntagen til testkemikaliets egenskaber. |
| | Aktiviteter beskrevet for dag 3 udføres dagligt (som minimum på hverdage). |

▼M4

*Tillæg 4*

**Syntentisk jord — anbefalinger vedrørende fremstilling og opbevaring**

Da naturlig jord fra en bestemt kilde ikke er tilgængelig hele året, og da hjemmehørende organismer og tilstedeværelsen af mikroforurenere kan påvirke testen, anbefales det at bruge et syntetisk substrat, den syntetiske jord i henhold til kapitel C.8 i dette bilag, Toksicitet for regnorme (48), i denne test. Flere forsøgsarter kan overleve, vokse og forplante sig i denne jord, og der opnås maksimal standardisering samt sammenlignelighed af test- og dyrkningsbetingelser inden for og mellem laboratorier.

Jordbestanddele

| | | |
|---|---|---|
| Tørv: | 10 % | Sphagnumtørv i overensstemmelse med OECD Guideline 207 no. (48) |
| Kvartssand: | 70 % | Industrielt kvartssand (lufttørret); kornstørrelse: over 50 % af partiklerne skal være fra 50-200 μm, men alle partikler skal være ≤ 2 mm |
| Kaolinholdigt ler: | 20 % | Kaolinindhold ≥ 30 % |
| Calciumcarbonat: | ≤ 1 % | $CaCO_3$, pulveriseret, kemisk rent |

Det organiske kulstofindhold i den syntetiske jord kan evt. reduceres, f.eks. ved at reducere indholdet af tørv til 4-5 % af tørjorden og øge sandindholdet tilsvarende. Ved en sådan reduktion af det organiske kulstofindhold kan mulighederne for, at testkemikaliet adsorberes til jorden (organisk kulstof), reduceres, og testkemikaliets tilgængelighed for ormene forøges (74). Det er blevet påvist, at Enchytraeus albidus og Eisenia fetida kan opfylde validitetskriterierne for reproduktion ved test i feltjord med lavere organisk kulstofindhold, f.eks. 2,7 % (33) (61), og erfaringer viser, at dette også kan opnås i syntetisk jord med 5 % tørv.

**Fremstilling**

De tørre bestanddele i jorden blandes grundigt (f.eks. i stor laboratoriemixer). Dette gøres ca. en uge, inden testen påbegyndes. De blandede tørre jordbestanddele fugtes med deioniseret vand mindst 48 timer inden tilsætning af testkemikaliet for at ækvilibrere/stabilisere surheden. Til bestemmelse af pH-værdien anvendes en blanding af jord og 1 M KCl-opløsning i forholdet 1:5. Hvis pH-værdien ikke er inden for det krævede interval (6,0 ± 0,5), tilsættes en passende mængde $CaCO_3$ til jorden, eller en ny batch jord fremstilles.

Den maksimale vandbindingsevne (WHC) for den syntetiske jord bestemmes i overensstemmelse med ISO 11268-2 (35). Mindst to dage inden påbegyndelsen af testen fugtes den tørre syntetiske jord ved at tilsætte så meget deioniseret eller rekonstitueret vand, at ca. halvdelen af det endelige vandindhold opnås. Det endelige vandindhold skal være 40-60 % af den maksimale WHC. Når testen påbegyndes, fordeles den fugtede jord i så mange batches som det anvendte antal testkoncentrationer og kontroller, og fugtindholdet justeres til 40-60 % af $WHC_{max}$ ved hjælp af en opløsning af testkemikaliet og/eller ved at tilsætte deioniseret eller rekonstitueret vand. Fugtindholdet bestemmes ved begyndelsen og slutningen af testen (ved 105 °C). Det skal være optimalt i forhold til artens behov. Fugtindholdet kan også kontrolleres på følgende måde: Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene.

▼M4

**Opbevaring**

De tørre bestanddele i syntetisk jord kan opbevares ved rumtemperatur indtil anvendelse. Den fremstillede og fugtede jord kan opbevares køligt i op til tre dage inden spiking. Fordampningen af vand skal minimeres. Jord, der er tilsat testkemikaliet, anvendes straks, medmindre information indicerer, at den pågældende jord kan opbevares, uden at det påvirker testkemikaliets toksicitet og biotilgængelighed. Prøver af spiked jord opbevares i det tilfælde under de betingelser, der anbefales for det pågældende testkemikalie, indtil analyse.

▼M4

*Tillæg 5*

**Arter af terrestriske oligochaeter, der anbefales til test af bioakkumulering fra jord**

**Regnorm**

Den anbefalede testart er Eisenia fetida (Savigny 1826), som tilhører familien Lumbricidae. Siden 1972 har den været opdelt i to underarter (Eisenia fetida og Eisenia andrei (10)). I henhold til Jaenike (36) er de ægte særskilte arter. Eisenia fetida er letgenkendelig på sine lyse, gule striber mellem leddene, mens Eisenia andrei er ensartet mørkerød. De stammer sandsynligvis oprindeligt fra området omkring Sortehavet, men findes i dag i hele verden, især i menneskeskabte levesteder, som f.eks. kompostbunker. Begge kan bruges til økotoksikologiske test og bioakkumuleringstest.

Eisenia fetida og Eisenia andrei kan fås i handelen, f.eks. som fiskemadding. Sammenlignet med andre lumbricidregnorme har de en kort livscyklus på ca. 2-3 måneder (ved rumtemperatur). Deres optimale temperatur er ca. 20-24 °C. De foretrækker relativt fugtige substrater med næsten neutral pH og et højt indhold af organisk materiale. Da disse arter har været anvendt bredt i standardiserede økotoksikologiske test i omkring 25 år, er deres dyrkning veletableret (48) (77).

Begge arter kan opdrættes i forskellige dyreekskrementer. Som avlsmedium kan anbefales af ISO (35) en blanding af lige dele tørv og ko- eller hestegødning. Mediet skal have en pH-værdi på ca. 6-7 (justeret med calciumcarbonat) og en lav ionledningsevne (under 6 mmhos eller 0,5 % saltkoncentration), og det må ikke være uforholdsmæssigt forurenet med ammoniak eller dyreurin. Kommerciel havejord fri for additiver eller syntetisk jord i henhold til OECD (48) eller en lige blanding af de to kan anvendes. Substratet bør være fugtigt, men ikke for vådt. Avlekasser med et rumfang på 10-50 l er passende.

For at få orm af standardalder og -masse er det bedst at starte dyrkningen med kokoner. Voksne orm sættes derfor i en avlekasse, der indeholder frisk substrat, med henblik på producere kokoner. Praktiske erfaringer har vist, at en populationstæthed på ca. 100 voksne orm pr. kg substrat (vådvægt) giver god reproduktion. Efter 28 dage fjernes de voksne orm. De regnorme, der klækkes af kokonerne, anvendes til test, når de er kønsmodne efter mindst to måneder, men højst efter 12 måneder.

Orm af de arter, der er beskrevet ovenfor, betragtes som sunde, hvis de bevæger sig gennem substratet, ikke forsøger at forlade substratet og formerer sig løbende. Meget langsom bevægelse eller gul bagende (i Eisenia fetidas tilfælde) indicerer udtømmelse af substrat. I det tilfælde bør der gives frisk substrat, og/eller antallet af orm pr. beholder bør reduceres.

**Yderligere udvalgte referencer**

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egele, P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims R W og Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London, 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. I: Earthworm Ecology — from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 s.

**Enchytraeider**

Den anbefalede testart er Enchytraeus albidus Henle 1837 (hvid kompostorm). Enchytraeus albidus er en af de største (op til 15 mm) arter af Enchytraeidae-slægten af Oligochaeter (annelida), og den findes i hele verden, f.eks. (8). Enchytraeus albidus findes på marine, limniske og terrestriske levesteder, primært i organiske materialer under nedbrydning (tang og kompost) og sjældent i engområder (42). Den brede økologiske tolerance og visse morfologiske variationer indicerer, at arten omfatter forskellige racer.

Enchytraeus albidus sælges som fiskefoder. Det bør undersøges, om bestanden er kontamineret af andre, normalt mindre arter (60). Hvis kontaminering forekommer, bør alle orm skylles med vand i en petriskål. Store voksne individer af Enchytraeus albidus udvælges derefter (ved hjælp af stereomikroskop) for at starte en ny bestand. Alle andre orm kasseres. Ormens livscyklus er kort, da den når sin modenhed mellem 33 dage (ved 18 °C) og 74 dage (ved 12 °C). Kun bestande, der har været i laboratoriet i mindst fem uger (en generation) uden problemer, bør anvendes i en test.

Andre arter af Enchytraeus-slægten kan også anvendes, navnlig Enchytraeus luxuriosus. Denne art er en ægte jordinhabitant, som er beskrevet for nylig i (65). Hvis andre arter af Enchytraeus anvendes, skal de identificeres klart, og begrundelsen for valget af art skal anføres i rapporten.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) er en art, der tilhører samme gruppe som Enchytraeus luxuriosus. Det er ikke med sikkerhed dokumenteret, at den findes i det fri, og er kun blevet beskrevet fra dyrkede regnormebestande og kompostbunker (Römbke 2003). Dens oprindelige økologiske behov kendes derfor ikke. Nylige laboratorieforsøg i forskellige feltjorde har dog bekræftet, at denne art udviser bred tolerance over for jordegenskaber, som f.eks. pH og tekstur (Jänsch et al. 2005). I de senere år er denne art ofte blevet anvendt i økotoksikologiske forsøg på grund af dens ukomplicerede formering og test, f.eks. Kuperman et al. 2003). Den er dog lille (3-12 mm; 7 mm i gennemsnit (Westheide & Müller 1996), og det gør den vanskeligere at håndtere end Enchytraeus albidus. Hvis denne art bruges i stedet for Enchytraeus albidus, kan testbeholderen være mindre, men det er ikke nødvendigt. Det skal desuden tages i betragtning, at denne art reproduceres meget hurtigt og har en generationstid på mindre end 20 dage ved 20 ± 2 °C (Achazi et al. 1999) og endda hurtigere ved højere temperaturer.

Enchytraeider af arten Enchytraeus albidus (og andre Enchytraeus-arter) kan avles i store plastikkasser (f.eks. 30 × 60 × 10 cm eller 20 × 12 × 8 cm, som er egnet til dyrkning af små orm) fyldt med en blanding af syntetisk jord og uforurenet havejord fri for additiver, som fås i handelen. Kompostmateriale bør undgås, da det kan indeholde toksiske kemikalier, som f.eks. tungmetaller. Fauna fjernes fra avlsjorden inden brug ved tredobbelt dybfrysning. Ren syntetisk jord kan også bruges, men reproduktionshastigheden kan være langsommere sammenlignet med hastigheden i blandede substrater. Substratet skal have en pH på 6,0 ± 0,5. Bestanden holdes i en inkubator ved en temperatur på 15 ± 2 °C uden lys. Temperaturer over 23 °C skal undgås. Det syntetiske/naturlige jord bør være fugtigt, men ikke vådt. Når jorden presses forsigtigt i hånden, skal små dråber vand vise sig mellem fingrene. Iltfattige betingelser skal undgås. Hvis der f.eks. bruges et låg, skal der være så mange huller i låget, at der kan ske en tilstrækkelig luftudskiftning. Jorden i avlekassen skal beluftes ved at blande den forsigtigt en gang om ugen.

▼M4

Ormene fodres mindst en gang om ugen ad libitum med havregryn, der anbringes i en fordybning på jordoverfladen og dækkes med jord. Hvis der stadig er foder tilbage i beholderen fra den forrige fodringsdato, tilpasses mængden af foder i overensstemmelse hermed. Hvis der vokser svampe på den resterende foder, erstattes den med en ny portion havregryn. For at stimulere reproduktionen kan havregrynene hver anden uge suppleres med vitaminberiget proteinpulver, som fås i handelen. Efter tre måneder overføres ormene til friskfremstillet dyrknings- eller avlesubstrat. Havregrynene, som skal opbevares i lukkede beholdere, autoklaveres eller opvarmes inden brug for at undgå infektion med melmider (f.eks. Glyzyphagus sp., Astigmata, Acarina) eller rovmider (f.eks. Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina). Efter desinfektion males foderet, så det nemt kan strøs ud på jordoverfladen. Gær eller fiskefoderet Tetra-Min® kan også bruges som foder.

Generelt er dyrkningsbetingelserne hensigtsmæssige, hvis ormene ikke forsøger at forlade substratet, bevæger sig hurtigt gennem jorden, har en blank overflade uden fastsiddende jordpartikler eller er mere eller mindre hvide, og hvis der ses orme i forskellige aldre. Orm betragtes faktisk som sunde, hvis de kontinuerligt formerer sig.

**Yderligere udvalgte referencer**

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W og Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W og Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.